

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Programa de Bioquímica, Biología Molecular,

Biomedicina y Biotecnología

Tesis Doctoral

**Tolerancia al estrés por cadmio y mercurio
en *Medicago* spp. Análisis de los mecanismos
implicados y potencial aplicación en
fitorremediación**

Vanesa Sánchez García de la Torre

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Programa de Bioquímica, Biología Molecular,

Biomedicina y Biotecnología

Tesis Doctoral

**Tolerancia al estrés por cadmio y mercurio
en *Medicago* spp. Análisis de los mecanismos
implicados y potencial aplicación en fitorremediación**

Memoria presentada por Vanesa Sánchez García de la Torre
Licenciada en Ciencias Ambientales, para optar al grado de Doctor

Directores del trabajo

José Javier Pueyo Dabad

M^a Mercedes Lucas Sánchez

Trabajo realizado en

Interacciones Beneficiosas Planta-Microorganismo

Departamento de Protección Vegetal

INSTITUTO DE CIENCIAS AGRARIAS

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES

CIENTÍFICAS

Madrid, 2015

El Dr. José Javier Pueyo Dabad y la Dra María Mercedes Lucas Sánchez certifican que el trabajo presentado en esta memoria por la Licenciada Vanesa Sánchez García de la Torre y que constituye su Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Ciencias Agrarias del CSIC, y dan fe de ello.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid a 15 de diciembre de 2014.

José Javier Pueyo Dabad

María Mercedes Lucas Sánchez

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una Beca de Formación de Profesorado Universitario (Ref. AP2009-0363) del **Ministerio de Educación Cultura y Deporte** y a los proyectos concedidos por la **Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha** (PAI07-0069-3817), la **Fundación Ramón Areces**, la **Comunidad de Madrid** (S-0505/AMB/000321 y S2009/AMB-1511), el **Ministerio de Ciencia e Innovación** (AGL2009-10371) y el **Ministerio de Economía y Competitividad** (AGL2013-40758-R).

A Christian, mi amor

Agradecimientos

To Janice De-Almeida. I want to thank you for inspiring me and giving me the confidence and the strength that I needed to continue with my scientific career. I will always consider you as my mentor.

Mucha gente podría pensar que familia solo hay una, esa que lleva nuestra sangre. En mi opinión yo tengo varias familias. Mi familia de sangre; formada por mi madre y su marido Miguel, que aunque estén lejos siempre los siento cerca. Mi padre, mi hermano, mi cuñada y mi sobrino que espero que estén orgullosos de este trabajo.

Ahora he comenzado mi propia familia con Christian, mi amor, que ha estado presente durante todo el desarrollo de esta tesis y la ha sufrido tanto como yo, no lo habría conseguido sin su apoyo y cariño. Además también agradezco los ánimos a mi suegra Toñi y mi cuñado Rubén, quienes siempre se han preocupado de saber si todo iba bien.

Durante esta etapa de mi vida además de realizar esta Tesis Doctoral he ganado otra familia, mi familia científica, con sus problemas y alegrías como todas las familias. Mis padres científicos, José Javier y Mercedes, a los que agradezco que apostaran por mí al inicio, su apoyo y confianza y sobre todo su paciencia conmigo y con mi “carácter”. Teo mi hermano mayor científico, mi modelo a seguir, me ha enseñado casi todo lo que sé y siempre ha estado disponible para ayudarme como buen hermano mayor. Mis otros hermanos científicos, Irene, Francesca, Raúl, Mario y Leticia, con muchísimos momentos buenos, risas y bromas y como buenos hermanos con alguna que otra riña. Durante este periodo hemos pasado por todo tipo de situaciones, alguna de ellas un poco surrealista debido al fuerte ritmo de trabajo y el consecuente cansancio. No me puedo olvidar de mis tías científicas, mi Lola y mi Bea, que siempre han estado ahí para apoyarme, consolarme y felicitarme, ellas me han enseñado a ver la vida desde otro punto de vista y a diferenciar que es importante y que no. También quiero darle las gracias a Carlos Granda, que ha sido mi primer alumno y me ha ayudado a ser mejor profesora.

Como en toda gran familia hay muchos otros parientes de los que no me puedo olvidar; Mercedes Fernández, Miguel Ángel Quiñones, Ana Rincón, Susana Fajardo, Beatriz Ruiz, Paquita Catalán y Cesar Morcillo, que en mayor o menor medida han hecho que mi tiempo en este laboratorio sea más llevadero.

En resumidas cuentas, todos y cada uno de vosotros habéis logrado que tenga la misma sensación de hogar cuando llego al laboratorio por las mañanas que cuando llego a mi casa por las tardes.

En estos años he hecho grandes amistades que espero no terminen nunca y aunque en las últimas etapas de mi Doctorado no han estado tan presentes no me puedo olvidar de Clara, MJ y Ana, a las que quiero mucho y agradezco que soportaran en más de una ocasión mis ataques neuróticos.

A Martín Crespi le agradezco que me brindara la oportunidad de trabajar en su laboratorio, gracias a lo que pude ampliar mi formación y disfrutar de una gran experiencia en París, y a Pilar Bustos le debo gran parte del éxito de ese periodo ya que sin su ayuda, apoyo y amistad esta experiencia hubiese resultado mucho peor.

Son muchas las personas que tengo en mente y que no menciono. A todos ellos les agradezco haber compartido conmigo estos años y les deseo lo mejor.

Este periodo se cierra y otro se abre, donde seguro conoceré mucha gente y haré nuevas amistades. Aunque suene un poco raro acepto con energía el fin de este ciclo, porque estoy un poco cansada de ver llegar a gente nueva, hacer amistades y luego ver como se marchan, aunque soy consciente de que trabajando en ciencia siempre tendré esta sensación. Para mí esto no es una despedida sino un hasta luego, así que no penséis que os librareis de mí tan fácilmente.

Muchísimas gracias a todos vosotros

NOTA AL LECTOR

En la redacción de esta Tesis Doctoral se han mantenido para describir términos técnicos algunos anglicismos cuya traducción no refleja exactamente el significado del término.

Resumen

El cadmio (Cd) y el mercurio (Hg) son dos de los elementos más tóxicos liberados al medio ambiente, constituyendo un grave riesgo para los ecosistemas y la salud humana. La fitorremediación es una tecnología emergente que pretende solventar problemas de contaminación mediante el uso de plantas, de manera económica y respetuosa con el medio ambiente, aunque todavía presenta algunas limitaciones, como es la identificación de variedades tolerantes y el conocimiento de los mecanismos que gobiernan la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Medicago truncatula* es una leguminosa forrajera de rápido crecimiento y considerable biomasa pudiendo constituir una buena candidata para su uso en fitorremediación. En esta Tesis Doctoral se analizó la tolerancia a Hg y Cd en 258 cultivares de *M. truncatula*. Para ello se desarrolló un método de *screening* mediante un sistema hidropónico miniaturizado, utilizando el crecimiento relativo de la raíz (RRG) en plántulas como indicador de la tolerancia. El *screening* fue posteriormente validado en sobres de crecimiento hidropónico con la determinación de diversos parámetros morfométricos. Se identificaron cuatro cultivares tolerantes a Hg y tres cultivares tolerantes a Cd con potencial aplicación en fitoextracción y/o fitoestabilización. Por otro lado, se estudiaron los mecanismos de respuesta y tolerancia a Cd en dos cultivares de *M. truncatula*, uno tolerante a Cd (*CdT*) y otro sensible (*CdS*), en diferentes estadios de desarrollo. El cultivar *CdT* mostró mejor respuesta frente al estrés por Cd que el cultivar sensible, con una germinación y movilización de reservas de la semilla más eficiente, una buena defensa antioxidante y menor daño oxidativo, tanto en plántula como en planta de 15 días. El cultivar *CdS* no fue capaz de controlar la acumulación de ROS con la primera barrera antioxidante y, aunque se indujo la biosíntesis de glutatión y de fitoquelatinas en plántulas, no fue suficiente para tolerar los niveles de estrés impuestos. También se estudió la función de la prolina en la tolerancia a Cd, utilizándose una línea transgénica de *M. truncatula* que sobreexpresa el gen Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa de *Vigna aconitifolia* (*VaP5CS*) y acumula prolina. Los resultados demostraron que la expresión de *VaP5CS* y la consecuente acumulación de prolina durante la exposición al Cd mejoraron la germinación, el estado fisiológico y la defensa antioxidante en diferentes estadios de desarrollo (plántula y planta de 32 días), además de atenuar el daño oxidativo. Para profundizar en los mecanismos de regulación postranscripcional en respuesta a Cd, en los cultivares *CdT* y *CdS* se estudió la expresión de varios miRNAs, identificados en ápices de raíz de *M. truncatula* sometida a diferentes estreses. Tres de los miRNAs analizados mostraron diferencias de expresión entre ambos cultivares. Se estudió en mayor detalle el papel del miRNA nmiR3, cuya expresión fue superior en el cultivar sensible y reguló negativamente la expresión varios genes implicados en el estrés por metales. Además, se obtuvieron raíces transformadas de *M. truncatula*, observándose que la inhibición de este miRNA disminuía el efecto dañino del Cd, mientras que su sobreexpresión tenía un efecto negativo en las raíces sometidas a estrés por Cd.

Summary

Cadmium and mercury are two of the most toxic compounds released to the environment, and pose a major risk to the ecosystems as well as to human health. Phytoremediation is an emergent technology that attempts to clean up polluted soils through the use of plants in an inexpensive and environmentally friendly manner. However, this approach presents some limitations, such as the identification of tolerant varieties and the knowledge of the mechanisms that govern heavy metal tolerance and accumulation. *Medicago truncatula* is a forage leguminous plant with a fast growth, high biomass production, which can be considered a promising candidate to be used in phytoremediation approaches. In this Thesis, Hg and Cd tolerance was analysed in 258 *M. truncatula* cultivars. A miniaturized hydroponic system was developed as screening method using the relative root growth (RRG) to assess metal tolerance at the seedling stage. The screening method was validated in growth pouches with the determination of several morphometric parameters. Four cultivars were identified as Hg tolerant and three cultivars were identified as Cd tolerant, with potential application in phytoextraction and/or phytostabilization. Cadmium toxicity and tolerance mechanisms were further investigated in two *M. truncatula* cultivars, one tolerant (*CdT*) and one sensitive (*CdS*) to this metal, at different developmental stages. The *CdT* cultivar showed a better response to cope with Cd, with an improved germination and efficient reserves mobilization in germinating seeds, a good antioxidant defence and lower oxidative damage in seedlings and in 15 day-old plants. The *CdS* cultivar could not handle the ROS accumulation using the primary antioxidative barrier. Although glutathione and phytochelatin biosynthesis were promoted at the seedling stage, it was not sufficient to elude the imposed stress. In addition, the function of proline in Cd tolerance was studied in a transgenic *M. truncatula* line (*M. truncatula* p18) overexpressing Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) from *Vigna aconitifolia*, which leads to proline accumulation. The results demonstrated that overexpression of *VaP5CS* and the subsequent proline accumulation during the Cd treatment improved germination, physiological state and antioxidant defence, and reduced oxidative damage at different developmental stages (seedlings and 32 day-old plants). To further analyse the posttranscriptional regulation mechanisms in response to Cd stress, the expression patterns of several miRNAs, previously identified in *M. truncatula* root tips submitted to different stresses, were analysed in cultivars *CdT* and *CdS*. Some of the miRNAs showed differential expression patterns between the cultivars. The role of nmiR3 was further investigated. Its expression was higher in the sensitive than the tolerant cultivar, and it negatively regulated some genes involved in metal stress response. In addition, the inhibition of this miRNA in *M. truncatula* transgenic roots decreased the detrimental effect of Cd, and conversely, its overexpression increased the harmful effects of the heavy metal in the transgenic roots.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCION	7
1. Contexto del proyecto	7
1.1. Problemática del mercurio y del cadmio	7
1.2. Fitorremediación	9
1.3. Importancia de las leguminosas	10
2. Interacción metales pesados- planta	11
2.1. Del suelo a las plantas: absorción, transporte y almacenamiento	11
2.2. Toxicidad de los metales pesados en plantas	12
2.3. Estrés oxidativo en plantas	13
3. Mecanismos de defensa	14
3.1. Antioxidantes enzimáticos	16
3.2. Antioxidantes no enzimáticos	18
3.2.1. Biosíntesis de glutatión	19
3.3. Moléculas que ligan metales	20
3.3. Prolina	21
4. Metales y modulación de la expresión génica	23
4.1. <i>Small</i> RNAs	24
4.2. MicroRNAs y estrés por metales en plantas	24
II. OBJETIVOS	29
III. MATERIALES Y METODOS	33
1. Material biológico	33
1.1. Plantas	33
1.2. Microorganismos	33
2. Cultivo de plantas	33
2.1. Soluciones nutritivas	33
2.2. Germinación	34
2.3. Sistema hidropónico miniaturizado	35
2.4. Crecimiento en sobres de cultivo hidropónico	36
2.5. Cultivo en contenedores forestales	36
2.6. Cultivo en placa	37
3. Screening de cultivares de <i>M. truncatula</i>	38
3.1. <i>Screening</i> en sistema hidropónico miniaturizado	38
3.2. Validación del procedimiento en sobres hidropónicos	38
4. Parámetros morfológicos	39
5. Actividades enzimáticas y contenido de metabolitos	39
5.1. Actividad α -amilasa	40
5.2. Actividad superóxido dismutasa	41
5.3. Actividad catalasa	41

5.4. Glutación	41
5.5. Prolina	42
5.6. Peroxidación de lípidos	42
6. Contenido de clorofilas	43
7. Contenido de Hg, Cd y otros elementos	43
8. Técnicas histoquímicas	43
8.1. Detección histoquímica de la peroxidación de lípidos	43
8.2. Detección histoquímica de la integridad de la membrana plasmática	44
9. Técnicas moleculares	44
9.1. Extracción de RNA total	44
9.2. Síntesis de cDNA	45
9.3. Cuantificación de mRNAs y miRNAs mediante qRT-PCR	45
9.4. Cultivo de microorganismos	46
9.5. Plásmidos recombinantes y su transferencia a <i>A. rhizogenes</i>	46
9.6. Transformación estable de raíces de <i>M. truncatula</i> cv. Jemalong	47
10. Técnicas bioinformáticas	49
10.1. Diseño de oligonucleótidos	49
10.2. Secuencias y alineamientos	50
11. Análisis estadísticos	50
11.1. Análisis generales	50
11.2. Análisis factorial (PCA) y generación de índices de tolerancia	53
IV. RESULTADOS	57
1. Estudio de la tolerancia a Hg y Cd e identificación de cultivares tolerantes en una colección de germoplasma de <i>M. truncatula</i>	57
1.1. Desarrollo de una metodología para el <i>screening</i> rápido de tolerancia a Hg y Cd en <i>M. truncatula</i>	57
1.2. <i>Screening</i> de tolerancia a Hg y a Cd en una colección de germoplasma de <i>M. truncatula</i>	58
1.3. Validación del <i>screening</i> en sobres de cultivo hidropónico	60
1.3.1. Análisis factorial y construcción de índices de tolerancia	64
1.3.2. Tolerante vs. sensible	67
1.4. Contenido de Hg, Cd y porcentajes de traslocación	68
1.5. Efecto del Cd sobre el estado nutricional	69
2. Caracterización de la respuesta a Cd para dos cultivares de <i>M. truncatula</i>, uno sensible y otro tolerante	71
2.1. Efecto del Cd sobre la germinación y la movilización de reservas en cotiledones	71
2.2. Expresión de genes de los principales componentes de la maquinaria antioxidante en plántulas en respuesta a Cd	72
2.3. Contenido de glutatión y daño oxidativo en raíces de plántulas expuestas a Cd	74
2.4. Capacidad antioxidante y daño oxidativo los cultivares <i>CdT</i> y <i>CdS</i> crecidos en contenedores forestales en presencia de Cd	76
3. Respuesta a Cd de la línea transgénica de <i>M. truncatula</i> p18	78

3.1. Efecto del Cd sobre la germinación	78
3.2. Evaluación de la tolerancia a Cd en sistema hidropónico miniaturizado	79
3.3. Expresión de genes relacionados con el metabolismo de prolina y los principales componentes de la maquinaria antioxidante en plántulas en respuesta a Cd	80
3.4. Efecto del Cd en plantas de <i>M. truncatula</i> p18 y WT crecidas en contenedores forestales	88
3.4.1. Supervivencia	89
3.4.2. Efecto del Cd sobre el estado fisiológico de <i>M. truncatula</i> p18 y WT	89
3.4.3. Efecto del Cd sobre el estado nutricional de <i>M. truncatula</i> p18 y WT	90
3.4.4. Contenido en Cd y porcentaje de traslocación	92
3.4.5. Capacidad antioxidante y daño oxidativo en respuesta a Cd en <i>M. truncatula</i> p18 y WT	93
4. MicroRNAs en respuesta a Cd en <i>M. truncatula</i>	96
4.1. Efecto del Cd sobre la expresión de los miRNAs en los cultivares <i>CdT</i> y <i>CdS</i>	96
4.2. Efecto del Cd sobre la expresión de los genes diana de nmiR3 en <i>CdT</i> y <i>CdS</i>	97
4.3. Caracterización funcional de nmiR3 mediante raíces transgénicas de <i>M. truncatula</i> cv. Jemalong	98
4.3.1. Estado fisiológico de las raíces transgénicas en respuesta a Cd	98
4.3.2. Patrones de expresión de nmiR3 y sus genes diana en las raíces transgénicas en respuesta a Cd	100
V. DISCUSION	105
1. Identificación de variedades tolerantes a Hg y Cd de <i>M. truncatula</i> y potencial uso en fitorremediación	105
2. Efecto del Cd sobre cultivares de <i>M. truncatula</i>	108
2.1. Efecto del Cd sobre el estado nutricional de cultivares tolerantes y sensibles	108
2.2. Respuesta a Cd en los cultivares tolerante y sensible <i>CdT</i> y <i>CdS</i>	108
3. Papel de la prolina en la tolerancia a Cd: Respuesta a Cd de la línea transgénica de <i>M. truncatula</i> p18	113
4. MicroRNAs en respuesta a Cd en <i>M. truncatula</i>	117
VI. CONCLUSIONES	123
VII. BIBLIOGRAFIA	127
ANEXO FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS	145
1. Tablas suplementarias	145
2. Figuras suplementarias	153
ANEXO PUBLICACIONES	155

ABREVIATURAS

%TF	Porcentaje de traslocación
6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa
AGO	Argonauta
APX	Ascorbato peroxidasa
ARFs	Factores de respuesta a auxinas
ASC	Ascorbato
ATFP	Proteína de unión a iones metálicos
ATP	Trifosfato de adenosina
bZip	Cremallera de leucina
CAT	Catalasa
<i>CdS</i>	Cultivar de <i>M. truncatula</i> sensible a Cd W6 6142
<i>CdT</i>	Cultivar de <i>M. truncatula</i> tolerante a Cd PI 516929
CYS	Cisteína sintasa
Cys	Cisteína
DCL	<i>Dicer-like</i>
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
dsRNA	RNA de doble cadena
ERF	Factor de respuesta a etileno
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GalLDH	Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa
GDSL	GDSL esterasa/lipasa
Glu	Acido glutámico o glutamato si está en su forma ionizada
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSHS	Glutación sintetasa
GSSG	Glutación oxidado
HEN1	<i>Hua Enhancer1</i>
hGSHS	Homoglutación sintetasa
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
MDA	Malondialdehído

MDHA	Monodehidroascorbato
MIM3	Construcción MIMICRY para inhibición de la actividad de nmiR3 en <i>M. truncatula</i>
miRNAs	MicroRNA
MR	Monodehidroascorbato reductasa
MTs	Metalotioneínas
MyB	Proteína de mieloblastosis
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
nat-siRNAs	<i>Natural antisense small interfering</i> RNAs
npc-RNAs	<i>Non protein-coding</i> RNAs
nmiR3-OE	Construcción para sobreexpresión de la actividad de nmiR3 en <i>M. truncatula</i>
NPGS	<i>National Plant Germplasm System</i>
nTI	Índice de tolerancia normalizado
O-AcSer	O-acetilserina
OAT	Ornitina δ -aminotransferasa
Orn	Ornitina
P5C	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato
P5CDH	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa
P5CR	Pirrolina-5-carboxilato reductasa
P5CS	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa
PC 1/2	Componente principal 1 y 2
PCA	Análisis de componentes principales
PCs	Fitoquelatinas
PDS5	Proteína de cohesión de cromátidas hermanas
Pro	Prolina
ProDH	Prolina deshidrogenasa
ProT	Transportador de prolina
PRTF	Factor de transcripción relacionado con la patogénesis
PUS	Pseudouridina sintasa
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
R/S	Relación raíz / parte aérea

RCC	Contenido relativo de clorofilas
RDR	RNA polimerasa dependiente de RNA
RNAi	RNA interferente
RNL	Numero relativo de hojas
ROS	Especies de oxígeno reactivas
RRDW	Peso seco relativo de la raíz
RRFW	Peso fresco relativo de la raíz
RRG	Crecimiento relativo de la raíz
RSDW	Peso seco relativo de la parte aérea
RSFW	Peso fresco relativo de la parte aérea
RWC	Contenido relativo de agua
SGS	Supresor del silenciamiento génico
siRNAs	<i>Small interfering</i> RNA
smRNAs	<i>Small</i> RNA
SOD	Superóxido dismutasa
ta-siARFs	<i>Trans-acting small interfering</i> RNAs de respuesta a auxinas
ta-siRNAs	<i>Trans-acting small interfering</i> RNAs
TCA	Acido tricloroacético
TF	Factor de transcripción
TBA	Acido 2-tiobarbitúrico
VPC	Valor propio de cada parámetro relativo
WT	<i>Wild-type</i>
βAla	β-Alanina
γEC	γ- glutamylcisteína
γECS	γ- glutamylcisteína sintetasa

I. Introducción

I. INTRODUCCION

1. Contexto del proyecto

1.1. Problemática del mercurio y del cadmio

El concepto de “metal pesado” ha sido muy discutido y son muchas las definiciones propuestas para este término (DalCorso *et al.*, 2013). Una de las más utilizadas hace referencia a elementos cuyo peso específico es superior a 5 g/cm³ o que tienen un número atómico por encima de 20 (Barceló and Poschenrieder, 1990; Elmsey, 2001). Muchos de estos elementos son requeridos en pequeñas cantidades o cantidades traza para el desarrollo de los procesos biológicos, considerándose elementos esenciales (Elmsey, 2001), pero pasado cierto umbral resultan tóxicos (DalCorso *et al.*, 2013). Otros, como el cadmio (Cd), el mercurio (Hg) o el plomo (Pb), no poseen función biológica conocida y su presencia a determinadas concentraciones causa serios problemas para los organismos (Peralta-Videa *et al.*, 2009). En cualquier caso, cuando se utiliza el término “metal pesado”, es casi siempre con una connotación negativa, haciendo referencia al riesgo de toxicidad para los seres vivos que genera su presencia al superar determinados niveles (DalCorso *et al.*, 2013).

Durante las últimas décadas, el aumento de la población mundial y el desarrollo económico de los países emergentes ha ido acompañado de un incremento en la demanda de metales pesados, como el Hg y el Cd. Esto se debe a sus múltiples usos en la sociedad moderna, que principalmente son, para el mercurio, el amalgamado de oro en yacimientos auríferos y la producción de cloro a escala industrial, y para el cadmio, la fabricación de PVC y la síntesis de metano (donde se utiliza Cd como catalizador). Además, ambos metales han sido muy utilizados en la producción de baterías, pilas y acumuladores eléctricos. La mayor parte de las emisiones antropogénicas de estos metales son debidas a la industria cloro-alcalina, la quema de combustibles fósiles y la mala gestión de desechos que los contienen. En cualquier caso, tanto el mercurio como el cadmio se encuentran de manera natural en la corteza terrestre, normalmente combinados con otros elementos formando compuestos sólidos estables.

A pesar de las restricciones en su uso en los diferentes países, su presencia a nivel mundial continua siendo muy elevada (Peralta-Videa *et al.*, 2009), y es por ello que siguen contemplándose en la legislación y en los planes de actuación. Por ejemplo en las últimas medidas tomadas por la Comisión Europea en su reglamento del 18 de septiembre de 2012, se prohíben las exportaciones de Hg, se restringe su uso en aparatos de medición de temperatura y se prohíbe el uso de Hg y Cd en baterías, pilas y acumuladores.

El Cd y el Hg están considerados como dos de los elementos liberados al medio ambiente más tóxicos para los humanos, según la Agencia de Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ASTDR, 1999; ASTDR, 2008).

En humanos, concentraciones de Hg superiores a 10 µg/L en sangre y concentraciones de Cd superiores a 10 nmol por mmol de creatinina provocan graves efectos tóxicos para la salud (Peralta-videa *et al.*, 2009) (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos de la toxicidad por Hg y Cd en mamíferos (extraído de Peralta-Videa *et al.*, 2009).

Metal	Toxicidad
Hg	<p>Aguda: Por inhalación de Hg elemental: fiebre, vómitos, diarrea, lesión pulmonar aguda.</p> <p>Por ingestión de sales orgánicas: gastroenteritis caústica.</p> <p>Crónica: Náuseas, sabor metálico, gingivo-estomatitis, temblor, neurastenia, síndrome nefrótico, hipersensibilidad, pelagra, síndrome del sombrerero loco (irritabilidad, hiperactividad, labilidad emocional, timidez y pérdida de memoria).</p> <p>Otros efectos: Tos, disnea, fiebre, temblores, malestar, neuropatía motora, enfermedad de las encías, delirios y alucinaciones.</p>
Cd	<p>Aguda: Neumonitis por inhalación de humos con óxidos de Cd.</p> <p>Crónica: Proteinuria, cáncer de pulmón, osteomalacia.</p> <p>Otros efectos: Daño renal y de médula, inhibición de progesterona y estradiol, alteraciones en el útero, los ovarios, disrupción endocrina, cáncer de mama y mortalidad cardiovascular.</p>

Estos elementos son muy peligrosos debido a su carácter lipofílico y su baja solubilidad en agua, lo que los hace muy difíciles de eliminar del organismo, provocando bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación en la cadena trófica (Higueras *et al.*, 2006; Peralta-videa *et al.*, 2009). También muestran una alta afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas, alterando los procesos biológicos (Sharma and Dietz, 2009). Además, en la naturaleza no pueden ser degradados y poseen una elevada persistencia en el medio ambiente (Bowen, 1979), siendo las plantas su principal vía de entrada en la cadena trófica (Peralta-videa *et al.*, 2009). Por ello, los niveles de estos metales pesados en el medio ambiente están regulados por la legislación nacional e internacional, siendo 1-1,5 mg/Kg para Hg y 1-3 mg/Kg para Cd los límites máximos permitidos por la Unión Europea en suelos cultivables para el Hg y el Cd, respectivamente (Polle and Schützendübel, 2003).

A pesar de todos los esfuerzos realizados, la acumulación de Hg y Cd en el medio ambiente continúa causando eventos de contaminación severa a lo largo de todo el mundo (Peralta-Videa *et al.*, 2009; Cuypers *et al.*, 2010; Clemens *et al.*, 2013) siendo de vital importancia, en el contexto del desarrollo sostenible, limitar el impacto negativo del Hg y el Cd en el medio ambiente, proponiendo soluciones para retirar, inmovilizar o reciclar estos metales de los suelos contaminados.

1.2. Fitorremediación

Los metales pesados no pueden ser degradados, pero se pueden retirar, extraer e inmovilizar en el suelo disminuyendo su disponibilidad.

Hoy en día sabemos que ciertas plantas son capaces de tolerar altos niveles de metales pesados e incluso acumularlos en grandes cantidades sin manifestar efectos fitotóxicos (Jabeen *et al.*, 2009).

En las últimas décadas, las fitotecnologías han aparecido como prometedoras estrategias alternativas a las técnicas convencionales de remediación, ya que suponen menor coste y son más respetuosas con el medio ambiente, adquiriendo mucha importancia en los sectores público y privado, en el contexto de un desarrollo sostenible (Prasad, 2003; Chaney *et al.*, 2007; Sarma, 2011). El término fitorremediación hace referencia al conjunto de estrategias basadas en el uso de plantas para resolver problemas de contaminación ambiental. En el caso de suelos contaminados con metales pesados se pueden utilizar dos estrategias de fitorremediación: la fitoestabilización y la fitoextracción (Krämer, 2005; Zhao and McGrath, 2009).

La fitoestabilización se fundamenta en proporcionar una cubierta de vegetación para las áreas contaminadas, evitando la erosión del suelo y reduciendo la movilidad y toxicidad de los metales pesados. Las plantas adecuadas para fitoestabilización de metales pesados han de desarrollar un sistema de raíces extenso que proporcione buena cobertura del suelo y han de tolerar metales pesados e idealmente acumularlos en las raíces.

La fitoextracción se basa en el uso de plantas tolerantes que pueden acumular y concentrar grandes cantidades de metales en su parte aérea, para ser recolectada posteriormente. Esta estrategia es la más efectiva en la descontaminación de suelos, pero también la más difícil técnicamente, puesto que no muchas plantas poseen la capacidad de concentrar metales y al mismo tiempo producir elevada biomasa.

En relación con la fitoextracción encontramos la fitominería, que trata de utilizar las plantas que crecen en áreas enriquecidas o contaminadas con metales pesados y extraerlos con fines comerciales, evitando el impacto negativo de las explotaciones mineras para el medio

ambiente (Chaney *et al.*, 2007). Desafortunadamente hoy en día la fitominería solo resulta rentable para la extracción de níquel.

Adicionalmente, la aparición de la Química Verde alienta y revaloriza el desarrollo de estrategias de fitorremediación, puesto que utiliza y recicla biomasa vegetal enriquecida con metales pesados, procedente de actuaciones de fitorremediación, para realizar procesos químicos, como por ejemplo, para purificar y producir catalizadores para la industria química con un menor impacto ambiental (Losfeld *et al.*, 2012; Escande *et al.*, 2014), siendo más compatible con el medio ambiente (Matlack, 2001).

El desarrollo de estas tecnologías es de vital importancia para alcanzar un verdadero desarrollo sostenible, pero para lograrlo se deben superar varias limitaciones, como por ejemplo que la mayoría de plantas tolerantes a metales pesados presentan baja producción de biomasa y un reducido sistema radical (Pilon-Smits, 2005). Otra limitación importante es el conocimiento escaso de los mecanismos de toxicidad, tolerancia y acumulación de metales pesados en las diferentes plantas. Por ello la identificación de plantas tolerantes a metales pesados y el estudio de los mecanismos de tolerancia y acumulación son extremadamente necesarios en la actualidad.

1.3. Importancia de las leguminosas

Las leguminosas constituyen el segundo grupo de plantas cultivables más importante, después de los cereales, ocupando un 12% de las tierras agrícolas a nivel mundial (Graham and Vance, 2003). Su importancia es debida a que son una de las mayores fuentes de alimentación humana y animal, aportando gran cantidad de proteínas, minerales (Ca, Fe, Cu, Zn, P, S, Mg), vitaminas hidrosolubles (tiamina, riboflavina, niacina) y abundantes compuestos secundarios importantes para la salud, como las isoflavonas. También son utilizadas para la obtención de aceites minerales y materias primas.

Las leguminosas capaces de establecer simbiosis con los rizobios del suelo juegan un papel fundamental en el medio ambiente, ya que esta cualidad les permite fijar nitrógeno atmosférico, no dependiendo de la fertilización nitrogenada. Por otra parte, la interacción simbiótica rizobio-leguminosa se ha propuesto como una interesante herramienta de biorremediación (Kuiper *et al.*, 2004; Pajuelo *et al.*, 2011). Los rizobios y otras bacterias que colonizan la raíz pueden aumentar la biodisponibilidad de los metales pesados y favorecer su absorción por la planta (De Souza *et al.*, 1999). Algunas leguminosas han sido probadas en la fitoextracción de metales en suelos contaminados (Sriprang *et al.*, 2002; Moreno-Jiménez *et al.*, 2011) y se ha constatado que la inoculación con rizobios aislados del propio suelo contaminado tiene un efecto positivo en su establecimiento y rendimiento (Dary *et al.*, 2010).

Entre las leguminosas, el género *Medicago* está formado principalmente por especies forrajeras. La alfalfa (*M. sativa*) es la especie más conocida, ampliamente utilizada y cultivada como pasto en todo el mundo.

Medicago truncatula (carretón o barrel medic) ha sido elegida como planta modelo de estudio de la biología de leguminosas, ya que es diploide, autógama, con un periodo de generación corto y elevada producción de semillas, su genoma se encuentra casi totalmente secuenciado (Young *et al.*, 2012) y puede ser transformada genéticamente (Barker *et al.*, 1990; Ray *et al.*, 2003). Además su genoma es muy cercano al genoma de *M. sativa*, convirtiéndola en una importante fuente de genes para mejora genética (Choi *et al.*, 2004). *M. truncatula* ha sido descrita como sensible a los metales pesados y a otros estreses (Chandran *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008a; Aloui *et al.*, 2009), pero diferentes cultivares pueden mostrar tolerancia (Sledge *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011).

Estas plantas tienen un rápido crecimiento y elevada producción de biomasa. Además, como leguminosas, pueden actuar como pioneras en ambientes degradados y pueden ser muy útiles para recuperar suelos contaminados, ya que ha sido descrito que el crecimiento de plantas pioneras puede incrementar el contenido de materia orgánica del suelo, mejorando los suelos degradados con metales (Arocena *et al.*, 2010). También se han utilizado en el estudio de la toxicidad y los mecanismos de tolerancia a metales pesados en leguminosas (Ortega-Villasante *et al.*, 2007; Marino *et al.*, 2013).

2. Interacción metales pesados- planta

2.1. Del suelo a las plantas: absorción, transporte y almacenamiento

Las plantas están expuestas a los metales principalmente a través de la fase acuosa del suelo y tienen tendencia natural a absorberlos, pero la efectividad de la absorción depende de su biodisponibilidad, es decir, de la cantidad de metales accesible para las plantas en el medio ambiente (Azadpour and Matthews, 1996). La fracción biodisponible de metal es la proporción de metal en forma iónica contenida en la solución del suelo y depende de factores físicos y químicos, como el pH, el potencial redox, la proporción de arcillas, el contenido de materia orgánica, etc. (Azadpour and Matthews, 1996). Además, las raíces de las plantas pueden modificar el pH del suelo y exudar compuestos que ligan metales, conocidos como fitometalóforos (por ejemplo fitosideróforos) que facilitan su solubilidad y absorción (Dong *et al.*, 2007; Maestri *et al.*, 2010).

Los metales disponibles en la solución del suelo son absorbidos por las raíces y transportados a través del cortex (Figura 1) vía extracelular (apoplástica) o vía intracelular (simplástica). Los solutos también pueden ser intercambiados entre ambas vías a través de la

membrana plasmática de las células, constituyendo la vía transcelular. Podemos encontrar absorción selectiva, dependiendo de los transportadores de metales, genéricos o específicos, y de los canales de transporte iónico ubicados en la membrana plasmática. Estos sistemas transportan un amplio rango de cationes al interior de las células de la raíz, y los metales pesados compiten de manera eficiente por los mismos transportadores que utilizan los elementos esenciales (Sarwar *et al.*, 2010; Maestri *et al.*, 2010; Conn and Gilliam, 2010).

Una vez en las plantas, los metales pueden ser almacenados en los tejidos de las raíces o trasladados a la parte aérea. Para trasladar los metales a la parte aérea, han de ser transportados a través del citoplasma de las células de la endodermis, para superar la banda de Caspary que bloquea el apoplasto y llegar al xilema, donde son transportados hasta la parte aérea en la savia bruta (Lux *et al.*, 2011). Tanto en la raíz como en la parte aérea, los metales pueden quedar ligados a diferentes tejidos o secuestrados en vacuolas (Maestri *et al.*, 2010).

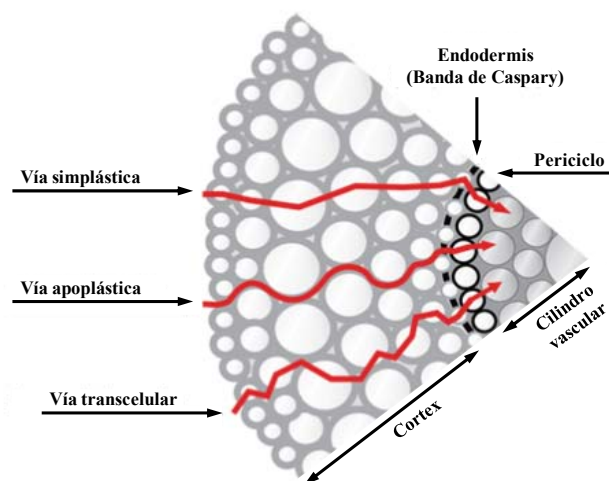


Figura 1. Vías apoplástica, simplástica y transcelular de transporte radial de solutos en la raíz (extraído y modificado de Johnson *et al.*, 2011).

2.2. Toxicidad de los metales pesados en plantas

De acuerdo con sus propiedades físicas y químicas, podemos diferenciar tres mecanismos de toxicidad de los metales pesados:

1. Reemplazo de iones en moléculas funcionales. Los iones de metales pesados pueden sustituir a los iones de los centros activos de las enzimas y componentes de señalización, afectando su funcionamiento (Polle and Schützendübel, 2003). Por ejemplo, el Cd puede desplazar iones esenciales (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} y Ca^{2+}) en proteínas y transportadores, compitiendo con la absorción de nutrientes y provocando deficiencia de los mismos (Sarwar *et al.*, 2010).

2. Unión a grupos funcionales. Los metales pesados muestran una gran afinidad por los grupos sulfhidrilo y los radicales amino de las proteínas y enzimas, inhibiendo su actividad (Hall, 2002; Navarro-Aviñó *et al.*, 2007). Por ejemplo, el Hg puede unirse a los grupos sulfhidrilo de los canales de transporte de agua (acuaporinas) induciendo el cierre estomático y obstruyendo físicamente el flujo de agua (Zhang and Tyerman, 1999).

3. Producción indirecta de especies reactivas de oxígeno (ROS). A pesar de que el Hg y el Cd no participan en la reacción de Fenton (Schützendübel and Polle, 2002; Mithöfer *et al.*, 2004), se sabe que ya en periodos cortos de exposición producen peroxidación de lípidos (Ortega-Villasante *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007; Sobrino-Plata *et al.*, 2009; Pérez-Chaca *et al.*, 2014). En cualquier caso, aún no se conoce bien como estos metales inducen la formación de ROS (Schützendübel and Polle, 2002; Gratão *et al.*, 2005) provocando estrés oxidativo.

Como consecuencia de la toxicidad de los metales pesados, la exposición de las plantas a los mismos provoca reducción del crecimiento, deficiencias nutricionales, afecta a la movilización de reservas durante la germinación, conduce a la alteración de procesos fisiológicos de vital importancia como la fotosíntesis, la respiración o transpiración (Benavides *et al.*, 2005; Clemens, 2006; Sarwar *et al.*, 2010; Rahoui *et al.*, 2010; Gallego *et al.*, 2012; DalCorso *et al.*, 2013), siendo la inhibición de la elongación de la raíz el efecto inducido más rápido de detectar a nivel morfológico (Sandalio *et al.*, 2001; Ortega-Villasante *et al.*, 2005; Sabreen and Sugiyama, 2008).

Las plantas pueden responder a los metales con rápidas modificaciones metabólicas, lo que se conoce como “aclimatación” (Pastori and Foyer, 2002; Mittler, 2006). Si el estrés prevalece, se desencadena una cascada de señalización secundaria mediada por moléculas como hormonas, ROS, etc., que se conoce como respuesta de “adaptación” (Pastori and Foyer, 2002; Mithöfer *et al.*, 2004). Estas adaptaciones implican cambios a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico, e implican regulación génica (Sanita di Toppi and Gabrielli, 1999). A pesar de estas respuestas, la intensidad del estrés puede superar el umbral de tolerancia de la planta, alterando el metabolismo y provocando daño oxidativo y muerte celular.

2.3. Estrés oxidativo en plantas

El estrés oxidativo es el factor central común de las plantas expuestas a los diferentes estreses bióticos y abióticos (Gratão *et al.*, 2005; Becana *et al.*, 2010). Este se produce como consecuencia de la acumulación de ROS (Mittler, 2002; Suzuki *et al.*, 2012) y conduce a drásticos cambios fisiológicos (Foyer and Noctor, 2005).

Las ROS son generadas en condiciones de estrés pero también en procesos metabólicos normales que utilizan O₂ and H₂O como aceptores o donadores de electrones (Foyer and

Noctor, 2005; Miller *et al.*, 2008). Durante la reducción secuencial del O_2 a H_2O , se producen radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (HO^{\cdot}) (Gratão *et al.*, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2012). Además, el H_2O_2 puede generar radicales HO^{\cdot} en presencia de hierro libre a través de la reacción de Fenton (Schützendübel and Polle, 2002), que consiste en la descomposición del peróxido de hidrógeno mediante la interacción con cationes metálicos generando radicales HO^{\cdot} . El radical HO^{\cdot} tiene una vida media muy corta pero es el agente oxidante más tóxico y reactivo que se conoce (Halliwell and Gutteridge, 1986). Durante el proceso, muchas moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos pueden sufrir oxidación (Buchanan *et al.*, 2000).

Cuando los niveles de ROS no pueden ser controlados se produce una explosión oxidativa que compromete la homeostasis celular, altera las cadenas de transporte electrónico, afecta al funcionamiento de enzimas y proteínas, provoca la peroxidación de lípidos y otras moléculas, daños en el DNA e induce el sistema de defensa antioxidante (Ortega-Villasante *et al.*, 2005; Smeets *et al.*, 2008; DalCorso *et al.*, 2008; Romero-Puertas *et al.*, 2012).

Las especies reactivas de oxígeno han sido comúnmente consideradas como moléculas dañinas, y sus concentraciones han de ser mantenidas lo más bajas posible. Este concepto ha cambiado, debido a las múltiples funciones de las ROS, de manera que es importante para las células mantener una estricta regulación de su concentración, pero sin eliminar estas moléculas por completo (Schützendübel and Polle, 2002). Se podría decir que las ROS son moléculas de naturaleza dual, actuando como indicadores de estrés y como mensajeros secundarios en la biología de plantas, interviniendo en procesos importantes como el desarrollo y expansión celular, el cierre estomático, la senescencia y muerte celular, la germinación y dormancia de semillas o la adaptación al estrés (Foyer and Noctor, 2003, 2005; Miller *et al.*, 2008).

3. Mecanismos de defensa

La respuesta de las plantas al estrés por metales no esenciales es compleja e implica muchos cambios fisiológicos, bioquímicos y genéticos para minimizar los daños derivados de la exposición a los metales (DalCorso *et al.*, 2008). Las plantas despliegan estrategias activas y pasivas para evitar la entrada de los metales en el organismo. En primer lugar, exudan ácidos orgánicos (malato o citrato) que ligan los metales a la matriz del suelo, evitando su absorción por las raíces (Dong *et al.*, 2007). En segundo lugar, la pared celular (con grupos histidina) y los carbohidratos celulares (mucílago y calosa) inmovilizan los iones tóxicos previniendo su entrada en el citosol (Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999).

Tan pronto como los elementos tóxicos superan estas barreras y penetran en el organismo elevando su concentración, se activan los mecanismos para controlar los niveles de ROS y detoxificar los metales pesados. Las células vegetales poseen diversos mecanismos de defensa antioxidante, que eliminan o previenen la formación de ROS, favoreciendo el equilibrio redox celular y evitando o aliviando el estrés oxidativo. Estos mecanismos implican el incremento de los niveles basales de enzimas y compuestos antioxidantes (Noctor and Foyer, 1998; Mittler, 2002; Yadav, 2010; Cuypers *et al.*, 2010). Además, las plantas han desarrollado mecanismos de detoxificación que retiran o secuestran los metales del organismo, reduciendo la estimulación del estrés oxidativo (Patra and Sharma, 2000; Cobbett and Goldsbrough, 2002; Hall, 2002; Cobbett, 2003). También se ha descrito la acumulación de solutos compatibles en respuesta a estrés osmótico, frío, calor, metales pesados, etc. (Delauney and Verma, 1993; Verma, 1999; Verdoy *et al.*, 2006), siendo destacable la prolina, que parece detoxificar metales pesados y estar asociada a la reducción del daño en membranas y proteínas (Schat *et al.*, 1997; Siripornadulsil *et al.*, 2002). Los sistemas de defensa antioxidante más importantes se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales mecanismos de defensa antioxidante en plantas.

Mecanismos de defensa antioxidante		
Defensa antioxidante	Antioxidantes enzimáticos	Superóxido dismutasa, catalasa/peroxidasas, enzimas del ciclo ascorbato-glutatión, enzimas que suministran poder reductor (NADPH)
	Antioxidantes no enzimáticos	Glutatión y homoglutatión, ascorbato, taninos, flavonoides, polifenoles, α -tocoferol, β -caroteno, precursores de lignina, ferritina
Moléculas que ligan metales	Péptidos ricos en cisteína	Metalotioneínas y fitoquelatinas
	Otras	Ácidos orgánicos, histidina, nicotianamina
Osmolitos	Prolina, glicina, betaína	

En cualquier caso, la resistencia y tolerancia de las plantas a los metales pesados depende de su capacidad para incrementar estos mecanismos de defensa ante el estrés y la

sobreproducción de ROS (Foyer *et al.*, 1994; Mittler, 2002; Hall, 2002; Paradiso *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2012).

3.1. Antioxidantes enzimáticos

La primera línea de defensa para luchar contra la acumulación de ROS es la detoxificación de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 mediante la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). Posteriormente la catalasa (CAT) y las peroxidasas se encargan de detoxificar el H_2O_2 (Schützendübel and Polle, 2002; Gratão *et al.*, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2012). Otras enzimas importantes para mantener la homeostasis ante un estrés oxidativo forman parte del ciclo ascorbato-glutatión (ASC-GSH). Además, recientemente se han considerado de importancia las enzimas que suministran poder reductor (deshidrogenasas dependientes de $NADP^+$) ya que soportan el buen funcionamiento del ciclo ASC-GSH (Valderrama *et al.*, 2006).

Superóxido dismutasas. Las SODs son una familia de metaloenzimas, que catalizan la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2) (Figura 2). En función del cofactor metálico presente en su centro activo se distinguen varios tipos: CuZnSOD, FeSOD y MnSOD. Estas enzimas son sintetizadas en el citoplasma, pero difieren en su localización subcelular. La CuZnSOD y la FeSOD son homodiméricas y están presentes en el citosol y los cloroplastos, mientras que la MnSOD es tetramérica y se localiza en mitocondrias y peroxisomas (Bowler *et al.*, 1994; Rubio *et al.*, 2001). La actividad de estas enzimas durante la exposición a metales pesados ha sido ampliamente estudiada, sobre todo en exposición a Cd (Cuypers *et al.*, 2010), siendo descritas tanto represiones como inducciones de su expresión génica y actividad (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006; Romero-Puertas *et al.*, 2007; Smeets *et al.*, 2009; Pérez-Chaca *et al.*, 2014). Estas discrepancias probablemente se deban a las diferentes condiciones de exposición, órganos e isoformas estudiadas (Rubio *et al.*, 2001, 2002; Romero-Puertas *et al.*, 2012).

Catalasas. Las catalasas son proteínas tetraméricas que catalizan la reducción de H_2O_2 a H_2O , de manera directa sin necesidad de ningún sustrato adicional (Figura 2), pero tienen baja afinidad por el H_2O_2 y su actividad sólo es eficiente a altas concentraciones de este sustrato (Mittler, 2002). Se localizan en peroxisomas, glioxisomas y orgánulos donde exista una elevada producción de H_2O_2 (Matés, 2000). En exposición a metales se ha observado inducción de la expresión de los transcritos de catalasa, sin embargo la actividad y contenido de proteína es afectada negativamente, lo que sugiere que los metales pueden modificar a nivel post-transcripcional y traduccional esta enzima (Romero-Puertas *et al.*, 2007; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2009). No obstante, se ha descrito que plantas que sobreexpresan CAT muestran menores niveles de fitotoxicidad por exposición a Cd (Guan *et al.*, 2009).

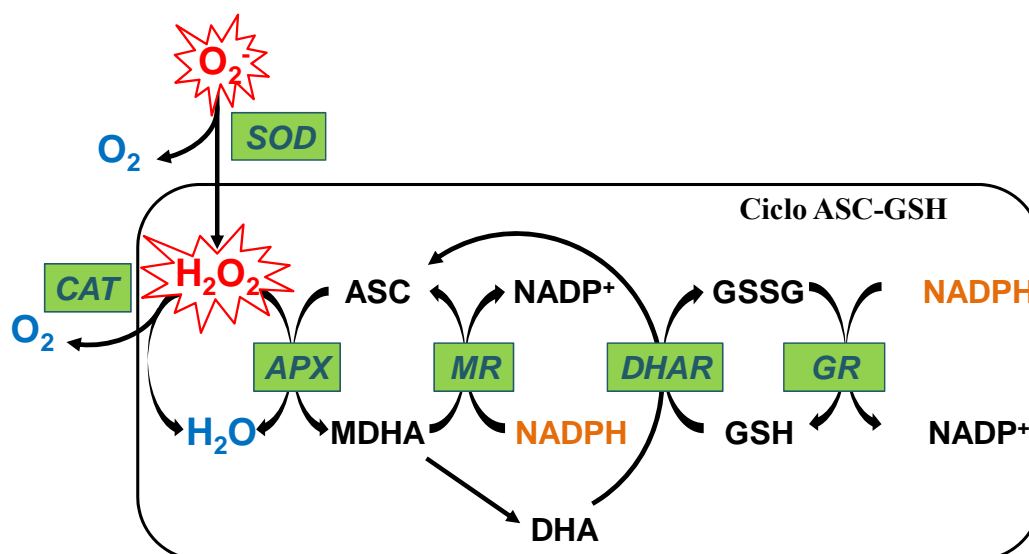


Figura 2. Principales enzimas antioxidantes en plantas. Superóxido dismutasa (SOD); catalasa (CAT); ascorbato peroxidasa (APX); monodehidroascorbato reductasa (MR); dehidroascorbato reductasa (DHAR); glutatión reductasa (GR); ascorbato (ASC); monodehidroascorbato (MDHA); dehidroascorbato (DHA); glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH).

Peroxidasas. Las peroxidasas son un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de componentes celulares mediante la reducción de H_2O_2 , hidroperóxidos orgánicos e hidroperóxidos lipídicos. Estas enzimas se pueden clasificar en función del sustrato que utilizan como donador de electrones: ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa, NADPH peroxidasas, guaiacol peroxidasas, etc. Las peroxidasas se localizan principalmente en el citosol, los plastidios, las mitocondrias y el núcleo. Al contrario que la catalasa, las peroxidasas son activas a bajos niveles de estrés oxidativo (Matés, 2000), sugiriendo un papel importante en la señalización celular donde intervienen ROS.

Las glutatión S-transferasas (GSTs) son peroxidasas que catalizan la detoxificación de peróxido de hidrógeno utilizando glutatión reducido (GSH) y hasta el momento son las únicas enzimas caracterizadas en plantas, que realizan esta actividad (Noctor and Foyer, 1998; Edwards *et al.*, 2000).

Enzimas del ciclo ascorbato-glutatión. El ciclo ascorbato-glutatión, también denominado “Ciclo de Foyer-Halliwell-Asada”, constituye una protección antioxidante esencial para las células (Noctor and Foyer, 1998; Foyer and Noctor, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2012), ya que sus enzimas retiran H_2O_2 en cloroplastos, citosol, mitocondrias y peroxisomas, y es especialmente importante en aquellos compartimentos celulares donde se acumula H_2O_2 y no existe CAT (Gutteridge and Halliwell, 2000). En este ciclo participan cuatro enzimas:

ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) (Figura 2). En la primera reacción, la APX oxida el ascorbato (ASC) para reducir el H_2O_2 a H_2O , generando monodehidroascorbato (MDHA). Este se oxida espontáneamente a dehidroascorbato (DHA), que es reducido de nuevo mediante la actividad GR, utilizando GSH como donador de electrones. Además, el MDHA puede reciclarse a ASC mediante la actividad MR, utilizando el poder reductor del NADPH.

La exposición a estrés oxidativo frecuentemente conduce al incremento de uno o más de los componentes de este ciclo, por ello ha sido descrito como un componente importante de los mecanismos de defensa antioxidante de las células vegetales y su buen funcionamiento confiere resistencia frente al estrés (Noctor and Foyer, 1998; Paradiso *et al.*, 2008).

Enzimas que suministran el poder reductor en forma de NADPH. Muchas de las reacciones enzimáticas descritas son dependientes de NADPH, de hecho esta molécula ha sido descrita como factor limitante en la capacidad antioxidante de las plantas (Foyer and Noctor, 2009). Por ello las enzimas relacionadas con su producción son importantes, perteneciendo alguna de ellas a la ruta de las pentosas fosfato. La primera enzima implicada en esta ruta es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), seguida de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH).

La G6PDH cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato, reduciendo NADP a NADPH. Esta enzima se ha localizado en el citosol, los cloroplastos y los peroxisomas. Existen evidencias que apoyan incluir la G6PDH en el grupo de enzimas antioxidantes puesto que el NADPH que genera es utilizado para mantener el glutatión en su estado reducido, jugando un papel clave frente al estrés oxidativo (Izawa *et al.*, 1998; Debnam *et al.*, 2004; Noctor, 2006). Otra importante enzima que aporta poder reductor es la isocitrato deshidrogenasa (ICDH), que cataliza la conversión reversible de isocitrato a 2-oxoglutarato y CO_2 produciendo NADPH. En plantas superiores se localiza principalmente en el citosol. Esta enzima ha sido descrita como clave en el reciclaje de NADPH y por tanto esencial para la defensa antioxidante ante condiciones de estrés (Marino *et al.*, 2007; Pérez-Chaca *et al.*, 2014).

3.2. Antioxidantes no enzimáticos

Podemos encontrar antioxidantes no enzimáticos en todos los compartimentos celulares, distinguiendo entre antioxidantes liposolubles e hidrosolubles.

Los antioxidantes liposolubles se encuentran en membranas celulares y protegen de la peroxidación lipídica (Halliwell and Gutteridge, 2007), siendo algunos de los más importantes

el β -caroteno, la zeaxantina y el α -tocoferol (vitamina E). El β -caroteno es un pigmento fotosintético que elimina el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) generado en el fotosistema II. La zeaxantina forma parte del ciclo de las xantofilas y su función es disipar el exceso de energía de excitación en condiciones de alta intensidad lumínica. El α -tocoferol se encuentra en las membranas tilacoidales y su función es interrumpir la peroxidación lipídica de las membranas inactivando el $^1\text{O}_2$. También son importantes los flavonoides y otros compuestos polifenólicos, ya que eliminan los radicales peroxilos producidos en las membranas durante la peroxidación de lípidos (Pinto *et al.*, 2003).

El ascorbato (ASC) y el glutatión (GSH) son los antioxidantes hidrosolubles más importantes en la protección y regulación de ROS en las células vegetales.

Ascorbato. El ASC (vitamina C) es el antioxidante no enzimático hidrosoluble más abundante en células vegetales. Esta molécula está implicada en multitud de procesos fisiológicos como la síntesis de hormonas, la regulación del crecimiento, la elongación de la raíz, la división celular y la señalización redox (Noctor and Foyer, 1998). Pero, sin duda, una de sus propiedades más importantes es su carácter antioxidante, participando en el ciclo ASC-GSH (Figura 2) reaccionando de manera directa con ROS. También puede actuar reduciendo la forma oxidada del α -tocoferol y como cofactor de la violaxantina de-epoxidasa en el ciclo de las xantofilas.

Glutatión. El glutatión (GSH; $\gamma\text{Glu-Cys-Gly}$) debe su función antioxidante al grupo tiol de la cisteína (Cys), que al oxidarse establece un puente disulfuro con el grupo tiol de una segunda molécula de GSH, dando lugar a su forma oxidada (GSSG). Otro tripéptido tiólico antioxidante es el homoglutatión (hGSH; $\gamma\text{Glu-Cys-}\beta\text{Ala}$), exclusivo de leguminosas. El GSH está considerado como la defensa más importante contra ROS, además de estar involucrado en funciones vitales, como el transporte y almacenamiento de azufre reducido y la protección contra metales tóxicos, puesto que es precursor de fitoquelatinas y participa en la detoxificación de xenobióticos a través de la conjugación con la glutatión S-transferasa (Edwards *et al.*, 2000; Mittler, 2002). Concretamente, el GSH ha sido descrito como clave para la defensa ante el estrés oxidativo inducido por los metales (Jozefczak *et al.*, 2012).

3.2.1. Biosíntesis de glutatión

La síntesis de GSH tiene lugar en dos pasos dependientes de ATP (Figura 3). La primera de las reacciones es catalizada por la γ -glutamilcisteína sintetasa (γECS), produciendo γ -glutamilcisteína (γEC) a partir de ácido glutámico (Glu) y Cys. Posteriormente, la enzima glutatión sintetasa (GSHS) añade un residuo de glicina (Gly) al extremo C-terminal del grupo

carboxilo de la γ EC, formando GSH. En el caso del homoglutación (hGSH) será añadido un residuo de β Ala por la enzima homoglutación sintetasa (hGSHS).

Esta ruta metabólica está sometida a una compleja regulación bioquímica y genética, siendo afectada por diferentes situaciones de estrés como la exposición a metales pesados, el estrés oxidativo y las deficiencias de nitrógeno y azufre (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). De hecho, la exposición a metales pesados suele promover la disminución del contenido de glutatión total, acompañado de la inducción de la expresión de algunas de las enzimas que participan en su biosíntesis (Schützendübel *et al.*, 2002; Ortega-Villasante *et al.*, 2005, 2007; Romero-Puertas *et al.*, 2007; Sobrino-Plata *et al.*, 2009), si bien, esta disminución en el contenido de glutatión también puede ser debida a una inducción de la síntesis de fitoquelatinas.

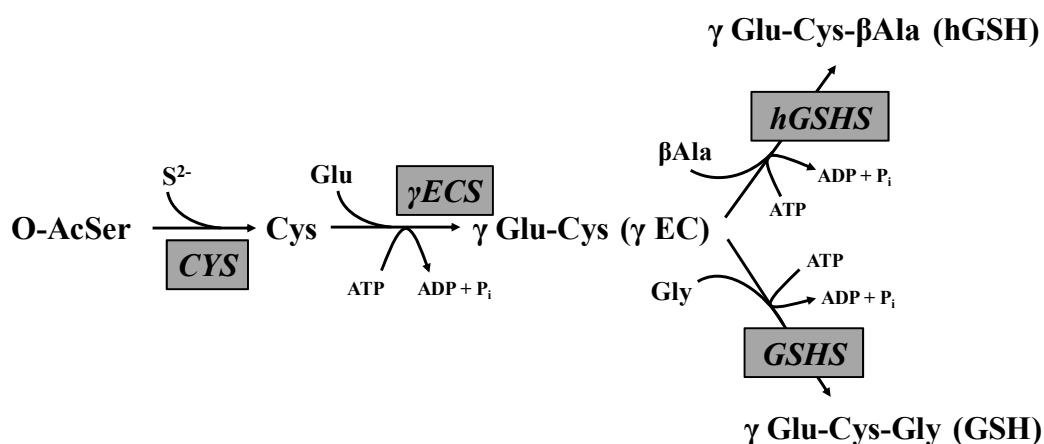


Figura 3. Síntesis del GSH y hGSHS. O-acetilserina (O-AcSer); cisteína sintasa (CYS); γ -glutamilcisteína sintetasa (γ ECS); glutatión sintetasa (GSHS); homoglutación sintetasa (hGSHS).

3.3. Moléculas que ligan metales

Los ligandos de alta afinidad mejor caracterizados en plantas son las metalotioneínas (MTs) y las fitoquelatinas (PCs), ambas con alto contenido en residuos de Cys (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Metalotioneínas. Las MTs son proteínas de bajo peso molecular codificadas genéticamente e inducidas en respuesta a los metales pesados. Las MTs han sido identificadas en animales, plantas y algunos procariontes, pudiéndose distinguir dos clases en función de su secuencia aminoacídica. La clase MT1 incluye únicamente las MTs de mamíferos, mientras que la clase MT2 incluye las MTs de invertebrados, plantas y hongos (Cobbett and Goldsbrough, 2002). A pesar de que las MTs juegan un papel importante en el metabolismo de los metales en mamíferos y bacterias, su función concreta en plantas no está claramente

establecida y no parecen ser tan decisivas en el proceso de quelación de metales pesados en plantas (Hall, 2002; Navarro-Aviñó *et al.*, 2007; DalCorso *et al.*, 2008).

Fitoquelatinas. Las PCs son péptidos que a diferencia de las MTs, son sintetizados enzimáticamente. Han sido identificadas en plantas, hongos y ciertos microorganismos (Cobbett, 2000). Su fórmula general es $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-X}$ ($n=2-11$), siendo X un aminoácido (Gly, β -Ala, Ser ó Glu) (DalCorso *et al.*, 2008).

La síntesis de PCs se realiza a partir de la γ -glutamylcisteina dipeptidil transpeptidasa, comúnmente denominada fitoquelatina sintetasa (PCS), la cual se expresa constitutivamente, pero también puede ser regulada a nivel transcripcional y postranscripcional por la exposición a metales pesados (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Puesto que la PCS utiliza GSH como sustrato, la regulación de la síntesis de PCs también puede efectuarse a través de la expresión de γ ECS y GSHS.

El mecanismo de acción de las PCs consiste en la formación de complejos no tóxicos con iones metálicos, mediante interacción con los grupos tiólicos de Cys. En primer lugar se forma un complejo PC-metal de bajo peso molecular (LMW), que posteriormente se une a iones sulfuro (S^{2-}) en el citosol, formando una molécula compleja de alto peso molecular (HMW). Estas moléculas atraviesan el tonoplasto (probablemente utilizando transportadores ABC) hacia las vacuolas y una vez allí los ácidos orgánicos presentes (malato, citrato, oxalato) retienen a los iones metálicos, disociando el complejo PC-metal (Cobbett, 2000; Cobbett and Goldsbrough, 2002; Hall, 2002; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; DalCorso *et al.*, 2008). Aunque aún no está claro qué ocurre con las PCs una vez disociado el complejo, se ha sugerido que este puede ser degradado en la vacuola o retornado al citoplasma para formar nuevos complejos con los iones de los metales (Gadapati and Macfie, 2006).

Las PCs han sido detectadas en tejidos y cultivos celulares de plantas expuestas a concentraciones fisiológicas de metales esenciales, como el Cu y el Zn, sugiriendo que juegan un papel fundamental en su homeostasis. Además, existen evidencias que muestran que las PCs juegan un importante papel en la detoxificación de metales, puesto que concentraciones elevadas de metales estimulan su síntesis (Ernst, 1998; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Dazy *et al.*, 2009). No obstante, su importancia en la tolerancia a metales pesados puede variar entre especies vegetales y el tipo de metal.

3.3. Prolina

La prolina es un osmolito que se acumula en diferentes organismos como plantas superiores, bacterias, invertebrados marinos, protozoos y algas, cuando están expuestos a

condiciones de estrés (sequía, salinidad, altas o bajas temperaturas, metales pesados, etc.) (Delauney and Verma, 1993; Schat *et al.*, 1997).

En plantas, en condiciones normales, la síntesis de prolina se realiza a partir de dos sustratos: la ornitina y el ácido glutámico (Orn y Glu) (Figura 4). En una primera reacción el Glu es fosforilado por la Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) para generar Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C), que es reducido por la pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR) a prolina (Pro). En las mitocondrias, la prolina es metabolizada por la acción de la prolina deshidrogenasa (ProDH), convirtiéndola de nuevo en P5C. Por acción de la Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P5CDH) y utilizando Orn, se recupera el Glu, cerrando el ciclo.

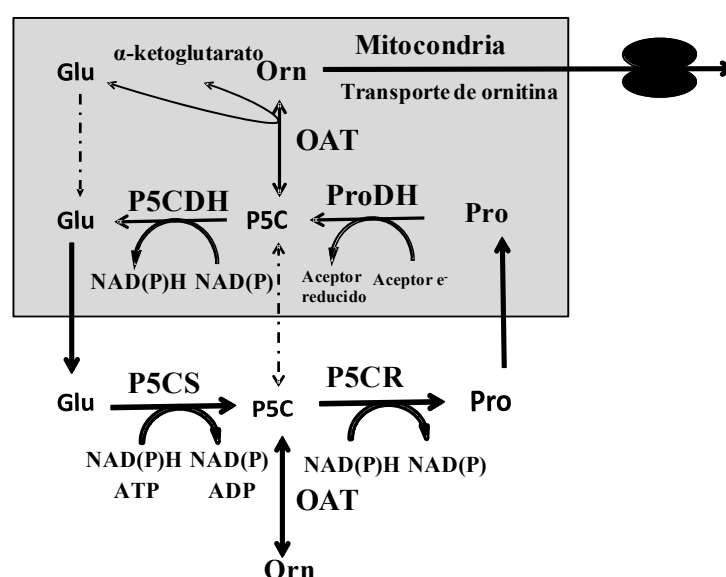


Figura 4. Ciclo de biosíntesis y reciclado de prolina. Prolina (Pro); glutámico (Glu); ornitina (Orn); Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS); Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C); pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR); prolina deshidrogenasa (ProDH); Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P5CDH); ornitina-aminotransferasa (OAT).

El papel que juega esta molécula en la tolerancia al estrés osmótico y salino está bien descrito, observándose una correlación positiva entre su acumulación y la tolerancia al estrés (Schat *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2005; Verdoy *et al.*, 2006). Otras funciones en situaciones de estrés han sido propuestas para este osmolito, por ejemplo, estabilizador de estructuras subcelulares, eliminador de radicales libres, depósito de energía, señalizador específico frente a estreses, etc. (Schobert and Tschesche, 1977; Smirnoff and Cumbes, 1989; Saradhi *et al.*, 1995; Schat *et al.*, 1997; Verma, 1999; Hong *et al.*, 2000; Maggio *et al.*, 2002). Además

también parece jugar un papel importante en la detoxificación y tolerancia a metales pesados (Schat *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1998; Siripornadulsil *et al.*, 2002).

4. Metales y modulación de la expresión génica

La respuesta de las plantas a los metales pesados depende de una intrincada cascada de transducción que comienza cuando la planta “siente” el metal. Esta cascada converge en una precisa modulación de la expresión de aquellos genes que responden a metales (Singh *et al.*, 2002). La regulación puede realizarse a nivel transcripcional, a través de las diferentes familias de factores de transcripción (TF) que respondan a metales pesados, como por ejemplo: Myb (proteína de mieloblastosis), HSF (factor de respuesta a choque térmico), bZip (cremalleras de leucina), ERF (factores de respuesta a etileno) y WRKY (por contener la secuencia aminoacídica WRKYGQK).

Los factores de transcripción se localizan en las regiones reguladoras en *cis*, que son las regiones de DNA contiguas a un gen y con efecto regulador sobre su transcripción. Estas regiones contienen la secuencia promotora del gen contiguo y la secuencia de los denominados *enhancer*, que pueden continuar varias decenas de kb más allá del promotor, en dirección 5'. Estas regiones son reconocidas por proteínas específicas que actúan como TF, necesarias para que la RNA polimerasa inicie la transcripción. Cuando estas proteínas provienen de elementos *cis* distantes, se dice que la regulación se realiza en *trans* (Kuhlemier, 1992). La mayoría de los elementos reguladores *cis* actúan a nivel transcripcional, sin embargo se han identificado algunos de ellos en las regiones promotoras, en dirección *downstream* de la caja TATA, que también modulan la expresión génica a nivel post-transcripcional (Lelli *et al.*, 2012).

La regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional se realiza mediante un proceso denominado ribo-interferencia, que consiste en el silenciamiento de genes específicos mediado por moléculas de RNA complementarias a un mRNA, inhibiendo su traducción a proteína o incluso conduciendo a su degradación (Fire *et al.*, 1998). Las moléculas de RNA que realizan esta función se denominan RNAs de interferencia (RNAi) y son moléculas de RNA que no se traducen a proteína (npc-RNAs), pero que son funcionales, participando en diversos procesos celulares, como el *splicing* alternativo en el procesamiento y maduración del mRNA (Mattick and Makunin, 2006).

En función de su tamaño podemos distinguir los npcRNAs largos (long-npcRNAs) con más de 24 nucleótidos (nt) y los npc-RNAs cortos (small RNAs) con un tamaño entre 20-24 nt, siendo estos últimos los principales responsables de la regulación post-transcripcional mediante RNAi (Vaucheret, 2006).

4.1. *Small RNAs*

Los *small RNAs* están presentes en bacterias, hongos, plantas y animales y en la última década sus funciones en el desarrollo y en la respuesta a diferentes estreses bióticos y abióticos han sido descritas (Khraiwesh *et al.*, 2012).

Todos los smRNAs se generan a partir de un precursor de doble cadena de RNA (dsRNA), que es cortado por la enzima *Dicer-like* (DCL) en el núcleo. Los diferentes smRNAs derivan de diferentes precursores, por lo que en función de su biogénesis (Figura 5) se clasifican en microRNA (miRNA), cuyo precursor está constituido por una hebra sencilla de RNA que se pliega sobre si misma formando un horquilla y *short interfering RNA* (siRNA), cuyo precursor proviene de una hebra doble de RNA. Existen diferentes tipos de siRNAs, distinguiéndose los *natural antisense* siRNAs (nat-siRNAs), cuyos precursores provienen de la complementariedad y solapamiento entre secuencias de elementos cis y trans, y los *trans-acting* siRNAs (ta-siRNAs), cuyos precursores resultan de la complementariedad de un miRNA específico con el transcrito que los genera. Estos siRNAs modulan la expresión a nivel post-transcripcional pero existen otros que actúan a nivel transcripcional, como los siRNAs asociados a la heterocromatina (Vaucheret, 2006; Bustos-Sanmamed *et al.*, 2013).

En general, como resultado de la acción de la DCL sobre el precursor de los smRNAs, se produce un dsRNA de 20-24 pares de bases (bp), con 2 nucleótidos libres en el extremo 3', que será estabilizado mediante metilación por la proteína *Hua Enhancer 1* (HEN1). Posteriormente una de las hebras del dúplex será transportada por el complejo *RNA-induced silencing complex* (RISC), que contiene una proteína denominada Argonauta (AGO) encargada de mediar en el silenciamiento génico por complementariedad entre el siRNA y su gen diana (Vaucheret, 2006; Mallory and Vaucheret, 2006; Bustos-Sanmamed *et al.*, 2013).

4.2. MicroRNAs y estrés por metales en plantas

Los miRNAs controlan diferentes procesos biológicos regulando negativamente la expresión de uno o más genes diana complementarios. La mayoría de miRNAs conocidos tienen un papel en procesos de desarrollo, aunque numerosos estudios demuestran que también participan en la regulación y respuesta a estreses, incluyendo la respuesta a metales pesados (Mallory and Vaucheret, 2006; Sunkar *et al.*, 2007; Guleria *et al.*, 2011; Gielen *et al.*, 2012; Yang and Chen, 2013; Gupta *et al.*, 2014). En respuesta a la exposición a metales tóxicos, las plantas modifican la expresión génica mediante la acción de miRNAs para regular: 1) la complejación de los metales, 2) la defensa antioxidante, y 3) la señal de transducción para el control de varios procesos biológicos (Mallory and Vaucheret, 2006; Sunkar *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2007; Gielen *et al.*, 2012; Khraiwesh *et al.*, 2012), pero

esta regulación puede variar en función de la especie de planta y las condiciones de exposición (Mendoza-Soto *et al.*, 2012; Yang and Chen, 2013).

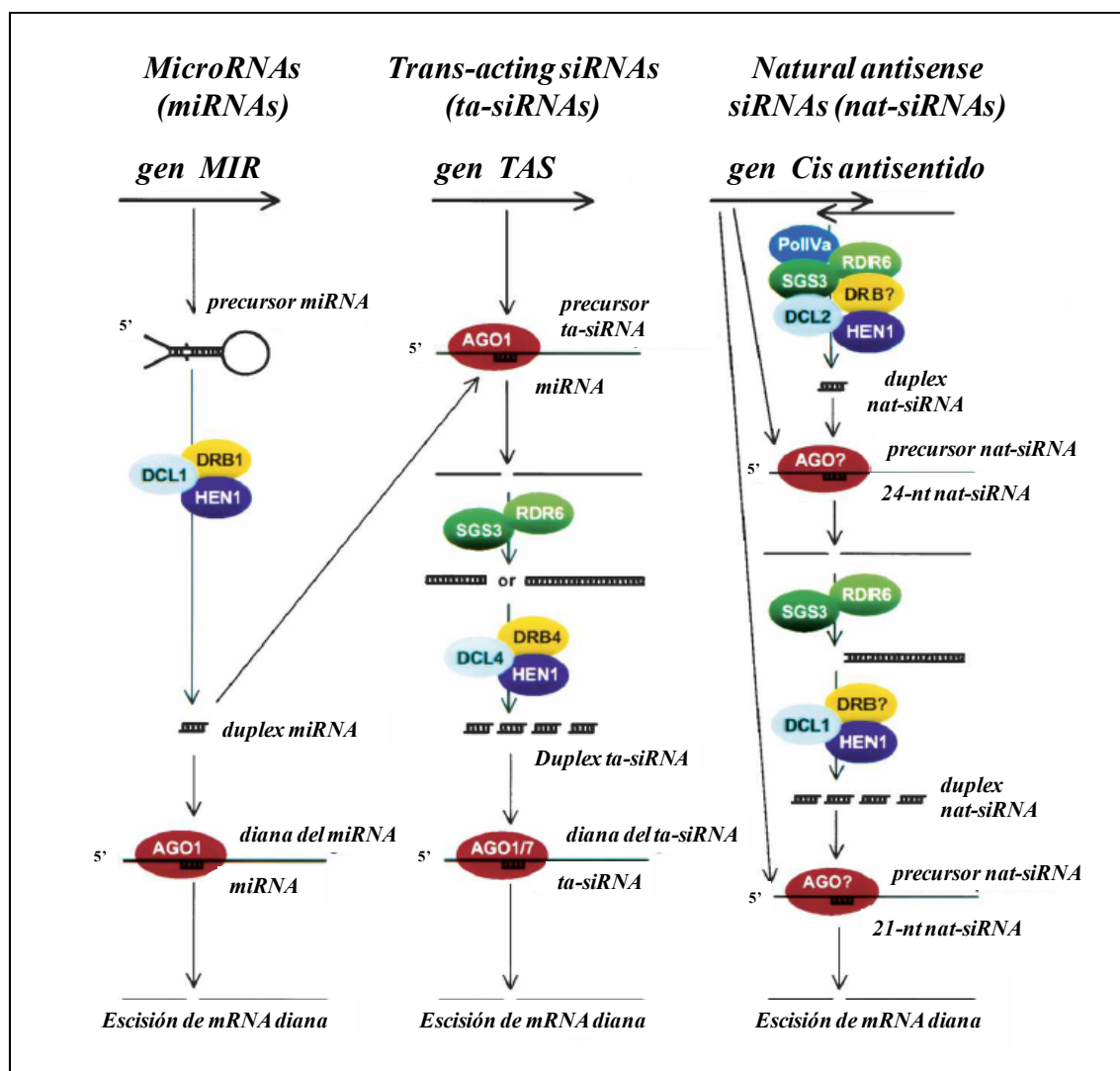


Figura 5. Biogénesis y mecanismo de acción de miRNAs, ta-siRNAs y nat-siRNAs (extraído y modificado de Vaucheret, 2006). El mismo color indica miembros de la misma familia génica. Los signos de interrogación indican que esos miembros participan en la ruta, pero su identidad exacta no ha sido determinada experimentalmente. La conexión entre miRNAs y ta-siRNAs indica la obligatoriedad de participación de un miRNA para la producción de ta-siRNAs. Las múltiples flechas provenientes del gen que origina los nat-siRNAs indican que el transcrito de RNA procedente de ese gen es utilizado en diferentes pasos en esta ruta. dsRNA-binding protein (DRB); Dicer Like (DCL); Hua enhancer (HEN); Argonauta (AGO); RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR); Supresor del silenciamiento génico (SGS) (estos dos últimos sintetizan la secuencia reversa complementaria de las hebras sencillas generadas a lo largo de las diferentes rutas).

En relación con la regulación de la respuesta a estrés oxidativo en plantas el primer miRNA descrito fue el miR398 (Sunkar *et al.*, 2006) que regula negativamente la

transcripción de CuZnSOD (Zhu *et al.*, 2011) y cuya región promotora es reconocida por el factor de transcripción SPL7 (*SQUAMOSA promoter binding protein-like 7*), induciendo la expresión de este miRNA por deficiencia de Cu en *A. thaliana* (Yamasaki *et al.*, 2009), e inhibiendo su expresión en respuesta a Cd en soja (Fang *et al.*, 2013). Se han descrito TF de genes implicados en crecimiento y senescencia (TCP) que son regulados negativamente por la inducción de miR319 en diferentes especies, en exposición a Cd, Hg, Mn y Al (Palatnik *et al.*, 2007). También se conocen factores de respuesta a auxinas (ARFs) afectados negativamente por la represión de miR390 en exposición a metales. Estos ARFs tienen un papel fundamental en el desarrollo de las raíces laterales y son regulados positivamente por ta-siARFs (ta-siRNAs). Sin embargo los ta-siARFs requieren la presencia de miR390 para su formación, por lo que la represión de miR390 por Cd, Al y Hg tiene un efecto inhibitorio en la producción y el crecimiento de las raíces laterales en *M. truncatula* (Zhou *et al.*, 2012b; Chen *et al.*, 2012b).

Diferentes análisis, basados en librerías genómicas y chips de cDNA, en diferentes plantas expuestas a metales tóxicos, han mostrado expresión diferencial de miRNAs muy conservados y sus genes diana, indicado su posible papel en la regulación y señalización de la homeostasis de los metales (Phillips *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2011; Gielen *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012b; Chen *et al.*, 2012a), pero son pocos los estudios que han realizado una caracterización funcional de estos miRNAs demostrando realmente este papel.

Un estudio reciente realizado por Formey *et al.* (2014) ha analizado el transcriptoma de small RNAs en diferentes ecotipos de *M. truncatula* expuestos a diversos estreses bióticos y abióticos, así como en interacciones simbióticas, poniendo de manifiesto que multitud de miRNAs participan en la respuesta a estos estreses e interacciones, confiriendo gran plasticidad a las plantas ante las condiciones ambientales. Diversas familias de miRNAs conservados se han descrito en respuesta a Cd, en diferentes especies de plantas, por ejemplo, en raíces de arroz expuestas a Cd durante 12 horas, se identificaron miR160, miR164, miR167, Osa- miR602 y Osa- miR604 (Huang *et al.*, 2009) y en hojas de *M. truncatula* expuestas durante 24h a Cd, a Hg o a Al, ha sido observada la sobreexpresión de miR393, miR171, miR319 y miR529, y la represión de miR166 y miR398, (Zhou *et al.*, 2008a).

Para profundizar en el papel de estos miRNAs en la respuesta a metales, además de identificarlos será necesario caracterizar su función y analizar su efecto sobre los genes diana en diferentes especies y cultivares, comprobando si estos mecanismos son conservados o por el contrario específicos de cada cultivar y/o tratamiento.

II. Objetivos

II. OBJETIVOS

Las fitotecnologías para la remediación de suelos contaminados con metales pesados se presentan como técnicas emergentes que por lo general van a suponer un menor coste económico, además de menor alteración o destrucción del medio natural. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas aún se encuentran en fase experimental y presentan limitaciones que ralentizan su puesta en práctica, como la escasez de especies vegetales potencialmente utilizables y la falta de conocimiento de los mecanismos de toxicidad, tolerancia y acumulación de metales pesados en las plantas. Por ello, los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral son:

1. Desarrollo de un método de *screening* rápido y fiable para evaluar la tolerancia a Hg y Cd en *Medicago truncatula* en estadio de plántula.
2. *Screening* de tolerancia a Hg y Cd en una colección de germoplasma de *M. truncatula*, validación del procedimiento y valoración del potencial de fitorremediación de los cultivares identificados como tolerantes.
3. Evaluación de los mejores parámetros indicadores de la tolerancia a Hg y Cd en función del estadio de desarrollo y generación de índices de tolerancia.
4. Estudio comparativo de la respuesta a Cd, a nivel fisiológico, bioquímico y molecular, para un cultivar sensible y un cultivar tolerante a Cd de *M. truncatula*.
5. Estudio del papel de la prolina en la tolerancia a Cd en *M. truncatula*. Evaluación de la tolerancia a Cd a nivel fisiológico, bioquímico y molecular, para una línea transgénica de *M. truncatula* que sobreexpresa el gen Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) de *Vigna aconitifolia* y acumula prolina.
6. Evaluación del papel de los miRNAs en la respuesta al estrés por Cd en *M. truncatula*. Análisis comparativo de la expresión de miRNAs en un cultivar sensible y un cultivar tolerante a Cd de *M. truncatula*. Caracterización funcional de miRNAs y genes diana de interés en respuesta a Cd mediante transformación de raíces de *M. truncatula* mediada por *Agrobacterium rhizogenes*.

III. Materiales y Métodos

III. MATERIALES Y METODOS

1. Material biológico

1.1. Plantas

Medicago truncatula (Gaertn.) cv. Parabinga

Para la selección y puesta a punto de las condiciones experimentales de los diferentes ensayos, se utilizaron semillas comerciales de *M. truncatula* (Gaertn.) cv. Parabinga.

M. truncatula (Gaertn.) cv. Jemalong (A17)

Para estudiar el papel de los miRNAs en la tolerancia a Cd, mediante la generación de transgénicas de raíz, se utilizó la variedad *M. truncatula* cv. Jemalong (A17), ya que el protocolo de transformación y obtención de plantas compuestas está optimizado para esta variedad.

Colección de germoplasma de *M. truncatula*

Para el estudio y la identificación de variedades tolerantes a Hg y/o Cd se utilizó una colección de germoplasma de 258 cultivares de *M. truncatula*, procedentes del Sistema Nacional de Germoplasma Vegetal del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (NPGS; <http://www.ars-grin.gov/npgs/>).

M. truncatula (Gaertn.) R-108-1 (c3) y línea transgénica *M. truncatula* p18

Para el estudio del papel de la prolina en la tolerancia al Cd se utilizó una línea transgénica de *M. truncatula* (*M. truncatula* p18) que sobreexpresa el gen Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) de *Vigna aconitifolia* y que fue generada en nuestro laboratorio (Verdoy *et al.*, 2006). El fondo genético fue *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (Trinh *et al.* 1998), que se utilizó como control *wild-type*.

1.2. Microorganismos

Para clonación de DNA se empleó *Escherichia coli* DH5 α y para la transformación de raíces de *M. truncatula* cv. Jemalong (A17) se utilizó *Agrobacterium rhizogenes* ARqual, portando el vector con los insertos de interés.

2. Cultivo de plantas

2.1. Soluciones nutritivas

Se utilizó la solución nutritiva Hoagland (Hoagland and Arnon, 1938) modificada, cuya composición se indica en la Tabla 3, para todos los ensayos en cultivo hidropónico y contenedores forestales y la solución Fahraeus modificada para *M. truncatula* (Boisson-dernier *et al.*, 2001) indicada en la Tabla 4, para la generación y crecimiento de plantas transgénicas de raíz.

Tabla 3. Composición de la solución nutritiva Hoagland modificada para *M. truncatula*.

Nutriente	Concentración (g/L)
KNO ₃	2,02
KH ₂ PO ₄	0,68
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,182
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,615
K ₂ SO ₄	0,109
Hampiron, 6,5% Fe (Rhône Poulenc)	0,205
Solución A	1,35 mL
Solución A	
Nutriente	Concentración (g/L)
H ₃ BO ₃	11
MnSO ₄ ·H ₂ O	6,2
KCl	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5
H ₂ SO ₄	0,5

Tabla 4. Composición de la solución nutritiva Fahraeus modificada para *M. truncatula*

Nutriente	Concentración (g/L)
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,4
NH ₄ NO ₃	1
KH ₂ PO ₄	0,7
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
Fe-EDTA	0,01
H ₃ BO ₃	0,0001
MnSO ₄	0,0001
ZnSO ₄	0,0001
Na ₂ MoO ₄	0,0001
CuSO ₄	0,0001

Las soluciones se prepararon con agua desionizada por ósmosis reversa y posteriormente fueron esterilizadas mediante autoclavado (120°C, 20 minutos).

2.2. Germinación

Todas las semillas utilizadas en este trabajo se escarificaron y esterilizaron de manera previa a los experimentos. La escarificación se realizó mecánicamente (papel de lija nº2), para facilitar la hidratación necesaria para su germinación. A continuación las semillas fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio (10% v/v), durante 15 minutos en agitación suave y seguidamente fueron lavadas de manera repetida con agua desionizada estéril (4 lavados x 20 min/lavado). Las semillas se mantuvieron en agua desionizada estéril a 4°C durante una noche

para completar su imbibición. Finalmente se germinaron en placas de Petri de 150 mm de diámetro con agar (1%), bajo condiciones controladas de crecimiento (25/19°C, 16/8h, oscuridad) durante 48h. Las placas se mantuvieron en posición vertical para evitar que las radículas se introdujeran en el agar.

Para la realización de experimentos de germinación, las semillas de la línea transgénica p18 y su fondo genético, tras la escarificación y esterilización, se colocaron en placas de Petri de 150 mm de diámetro conteniendo agar al 1% (v/v) con diferentes concentraciones de CdCl_2 (0-1,5 mM), añadido al agar atemperado tras el autoclavado. Durante la aplicación del tratamiento las placas se mantuvieron en oscuridad, midiéndose el porcentaje de germinación a los 7 días. Se utilizaron 12 semillas por réplica (placa) y 3 réplicas por tratamiento y línea. Se determinaron los porcentajes de germinación, calculándose con respecto a su control (ausencia de Cd).

2.3. Sistema hidropónico miniaturizado

El sistema hidropónico miniaturizado (Figura 6) se basó en el descrito por otros autores (Heidstra, 1994; Ortega-Villasante *et al.*, 2005), con modificaciones. Este sistema está compuesto por una cubeta Schieferdecker de cristal para tinciones, conteniendo 250 mL de solución nutritiva Hoagland (Tabla 3), donde se coloca una lámina de Fompex[®] con perforaciones y en flotación. En dichas perforaciones se colocaron las plántulas germinadas, de manera que la parte aérea permaneció fuera de la solución nutritiva. En cada caja se dispusieron no más de 60 plántulas. Toda la parte inferior de la cubeta se cubrió con papel de aluminio para evitar, en la medida de lo posible, la entrada de la luz. Las plántulas fueron aclimatadas al sistema durante 24 h antes de aplicar los tratamientos.



Figura 6. Sistema hidropónico miniaturizado.

2.4. Crecimiento en sobres de cultivo hidropónico

Las plántulas germinadas de *M. truncatula* fueron crecidas en sobres de cultivo hidropónico (CYG Seed Germination Pouches, Mega International, Minneapolis) conteniendo 50 mL de solución nutritiva; los sobres se cubrieron con papel de aluminio para proteger las raíces de la luz (Figura 7). En cada sobre se dispusieron 5 plántulas.

Todas las plántulas fueron aclimatadas a los sobres durante 24 h de manera previa a los tratamientos. Para seleccionar las condiciones óptimas para los experimentos de exposición a Hg y Cd en sobres, las plántulas previamente aclimatadas, fueron expuestas a diferentes concentraciones de Hg (0-40 μM HgCl_2) y Cd (0-200 μM CdCl_2) en la solución nutritiva, durante 20 días. Las soluciones nutritivas (50 mL por sobre) se sustituyeron cada 48 h. Se analizaron de 5 a 10 sobres para cada tratamiento



Figura 7. Sobres de cultivo hidropónico.

2.5. Cultivo en contenedores forestales

Las plántulas germinadas se colocaron en contenedores forestales (Figura 8) de 5 cm de diámetro, 16 cm de profundidad y 200 mL de volumen (RayLeach Cone-tainers, Tangent, Oregon, EEUU), conteniendo vermiculita (Asfaltex; Sant Cugat del Vallès, España) lavada durante 72 h con agua destilada y posteriormente autoclavada a 120°C durante 20 minutos. Se utilizaron dos plántulas por contenedor y se crecieron durante 7 días, regándose con 40 mL de agua destilada estéril cada 48 h. Tras dicho periodo se retiró una de las plántulas de cada contenedor y se comenzó el tratamiento. Las plántulas fueron expuestas a 0 ó 100 μM CdCl_2 , en la solución nutritiva, durante 15 días. El riego de la solución correspondiente (40 mL) se realizó cada 48 h. Al final del experimento la raíz y la parte aérea fueron congeladas por

separado en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su uso. Se utilizaron 10 plantas por tratamiento y cultivar.

En los experimentos con la línea transgénica p18 y su fondo genético, las plántulas germinadas se colocaron en los contenedores forestales siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Las plántulas fueron expuestas a diferentes concentraciones de Cd ($0\text{--}1\text{ mM CdCl}_2$), durante 32 días. El riego con 40 mL de la solución correspondiente se realizó cada 48 h. Al final del experimento se cosecharon los tratamientos correspondientes a 0 y $100\text{ }\mu\text{M}$ de CdCl_2 . Una parte del material se utilizó para las diferentes determinaciones morfométricas y fisiológicas y otra parte del material fue congelado en nitrógeno líquido, separando la raíz y la parte aérea y conservándose a -80°C hasta su uso. Se utilizaron 10 plantas por tratamiento y cultivar.

Se determinaron los porcentajes de supervivencia de *M. truncatula* p18 y su fondo genético, expuestas a diferentes concentraciones de Cd ($0\text{--}1\text{ mM CdCl}_2$) durante 32 días, calculándose relativos a su control (ausencia de Cd).

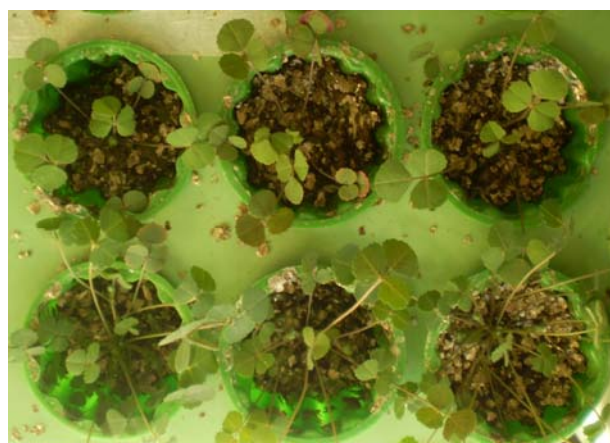


Figura 8. Cultivar tolerante a Cd (*CdT*; PI 516929) crecida en contenedores forestales.

2.6. Cultivo en placa

Plantas de *M. truncatula* cv. Jemalong (A17) transformadas con *A. rhizogenes* (Materiales y Métodos 9.6.) fueron crecidas en placa con medio sólido (agar 1,5 % p/v) Fahraeus modificado, conteniendo kanamicina (20 mg/L) y papel de filtro previamente autoclavado para evitar la penetración de la raíz en el agar, en ausencia o presencia de Cd ($75\text{ }\mu\text{M}$ de CdCl_2) durante 7 días. Para ello se añadieron 5 mL de solución con la concentración de Cd correspondiente a cada placa. La solución de metal se preparó con agua estéril y se re-esterilizó mediante una membrana de celulosa de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Millex[®]). Al finalizar el tratamiento, las raíces fueron cosechadas, utilizándose parte del material para la determinación de diversos parámetros morfométricos (5 a 10 placas por construcción y

tratamiento, conteniendo no más de 8 plantas por placa) y otra parte fue inmediatamente congelada en nitrógeno líquido (4 a 5 réplicas por construcción y tratamiento, conteniendo cada réplica una mezcla de raíces de 10 plantas) y conservada a -80°C hasta su uso.

3. Screening de cultivares de *M. truncatula*

3.1. Screening en sistema hidropónico miniaturizado

Para determinar las condiciones óptimas de los ensayos de tolerancia a Hg y Cd, se utilizaron plántulas de *M. truncatula* (Gaertn.) cv. Parabinga. Estas, previamente aclimatadas como se describe en el apartado 2.3. de Materiales y Métodos, fueron expuestas a diferentes concentraciones de Hg (0-7 μM HgCl_2) y de Cd (0-40 μM CdCl_2) en la solución nutritiva, durante 48, 72 y 96 h. Las soluciones se sustituyeron a diario (250 mL por caja) para garantizar el mantenimiento de las concentraciones de metal y las propiedades de la solución nutritiva. Se analizaron de 10 a 30 plántulas para cada tratamiento y tiempo de exposición.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas, se realizó un screening de tolerancia a Hg y Cd en la colección de germoplasma de *M. truncatula*. Las plántulas germinadas de los 258 cultivares fueron aclimatadas al sistema hidropónico miniaturizado y posteriormente se sometieron a las condiciones seleccionadas para Hg (0 y 4 μM HgCl_2) y para Cd (0 y 10 μM CdCl_2), durante 48 h. Se analizaron de 10 a 30 plántulas por cultivar y tratamiento.

Tanto para la puesta a punto del sistema hidropónico miniaturizado, como para la realización del *screening* de tolerancias a Hg y Cd, se utilizó el crecimiento relativo de la raíz (*Relative Root Growth*, RRG) como parámetro indicador de la tolerancia. Este parámetro se calculó midiendo la longitud de las radículas antes y después del tratamiento, calculándose el incremento para cada una de las raíces tratadas (Δ longitud raíz_{Metal}) y normalizándose en relación al incremento de las raíces en ausencia de tratamiento (Δ longitud raíz_{Control}), de acuerdo a la siguiente expresión: $\text{RRG} = (\Delta \text{ longitud raíz}_{\text{Metal}} / \Delta \text{ longitud raíz}_{\text{Control}}) \times 100$.

3.2. Validación del procedimiento en sobres hidropónicos

Algunos cultivares de la colección de germoplasma fueron seleccionados para los experimentos de validación del *screening* de tolerancia a Hg y Cd en el sistema miniaturizado. Las plántulas germinadas de estos cultivares se colocaron en sobres de cultivo hidropónico y fueron cultivadas como se describe en el apartado 2.4. de Materiales y Métodos. Las plantas se sometieron a las condiciones seleccionadas para Hg (0 ó 20 μM HgCl_2) y Cd (0 ó 100 μM CdCl_2), durante 12 días. Las soluciones (50mL por sobre) se sustituyeron cada 48h. Se analizaron de 5 a 10 sobres (no más de 5 plantas por sobre) por cultivar y tratamiento.

4. Parámetros morfológicos

Los parámetros morfométricos que se analizaron en los diferentes ensayos fueron: el número de hojas (NL), la longitud de la raíz principal (RG) y los pesos frescos de la raíz (RFW) y la parte aérea (SFW). Las raíces y parte aérea se mantuvieron en estufa a 60°C durante 72h para la determinación de los pesos secos de la raíz (RDW) y de la parte aérea (SDW). Los pesos de raíz y parte aérea se utilizaron para calcular la relación raíz / parte aérea (R/S). Todos los parámetros fueron normalizados en relación al control (ausencia de metal) de acuerdo a la siguiente ecuación: $RX = (\text{Parámetro } X_{\text{Metal}} / \text{Parámetro } X_{\text{Control}}) \times 100$.

En el caso de las raíces transgénicas se determinó además el contenido relativo de agua y el crecimiento diario de las raíces.

El contenido relativo de agua se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación: $WC = (FW - DW / HW - DW) \times 100$, donde FW es el peso fresco, DW es el peso seco y HW es el peso de la muestra totalmente hidratada. Este parámetro se normalizó en relación al control (ausencia de metal).

Para determinar el crecimiento de las raíces transgénicas, se marcó la posición de los ápices en la placa antes de aplicar el tratamiento, considerándose como posición inicial. Las placas conteniendo las plantas fueron fotografiadas a diario, durante los 7 días que duró el tratamiento, midiéndose el crecimiento diario de las raíces utilizando el software Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Finalmente, se calculó el ratio de crecimiento de las raíces transgénicas, expresado en cm/día.

5. Actividades enzimáticas y contenido de metabolitos

Para los ensayos de actividades enzimáticas y contenido de metabolitos, el material se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido de manera previa a la realización de las diferentes determinaciones.

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron utilizando un espectrómetro ultravioleta/visible Beckman Coulter DU 640 (Beckman Coulter, Fullerton, EEUU). Cuando los procedimientos lo permitieron, se utilizó un lector de microplacas Perkin Elmer multidetectores Victor TM X3 (Perkin Elmer, Waltham, Massachussets, EEUU).

Para aquellas determinaciones que lo requerían, se determinó el contenido de proteína soluble total mediante el método de Bradford (1976), midiendo la absorbancia a 595 nm tras la reacción con azul de Coomassie G-250. Se utilizó el micro-ensayo de Bio-Rad (Hercules, EEUU) con un calibrado de 0-10 µg de seroalbúmina bovina (Sigma).

Para determinar la actividad superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), el material vegetal pulverizado (aproximadamente 100 mg de raíz o 40 mg de parte aérea) se

homogeneizó con 400 μL de tampón de extracción, conteniendo fosfato potásico 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, polivinilpirrolidona (PVP-10) 1% (w/v) y Triton X-100 0,1% (v/v). El homogenado se centrifugó a 13.000 g durante 30 minutos a 4°C y posteriormente se recogió el sobrenadante.

Para las determinaciones de glutatión y prolina se realizaron los extractos con el material pulverizado de hojas y raíces, homogeneizándose con ácido sulfosalicílico al 3% (0,2 g peso fresco mL^{-1}). Los extractos se centrifugaron a 13.000 g y 4°C durante 20 minutos y el sobrenadante se utilizó para los ensayos.

5.1. Actividad α -amilasa

Las semillas, previamente escarificadas y esterilizadas, se colocaron en placas de Petri de 150 mm de diámetro con papel de filtro estéril. A la placa se añadieron 5 mL de agua estéril o CdCl_2 200 μM disuelto en agua estéril y re-esterilizado mediante membrana de 0,22 μm . El tratamiento duró 3 días en oscuridad, midiéndose el porcentaje de germinación al final. Posteriormente se retiraron las radículas y los cotiledones se recogieron y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, conservándose a -80°C hasta su uso. Se utilizaron de 4 a 6 réplicas (25 plántulas por réplica) para cada tratamiento y cultivar.

Para determinar la actividad α -amilasa en cotiledones, el material pulverizado se homogeneizó en tampón Imidazol-HCl 2 mM (pH 7,0) (0,1 g peso fresco mL^{-1}), y se mantuvo en hielo durante 2 minutos. Posteriormente el homogenado se centrifugó a 15.000 g durante 1 h a 0°C, recogándose el sobrenadante.

La actividad α -amilasa se determinó mediante el método descrito por Smith y Roe (1948). Para ello se mezclaron 100 μL de extracto con una solución que contenía 90 μg de almidón, NaCl 0,5 M, y tampón fosfato (KH_2PO_4 56 mM, Na_2HPO_4 144 mM, pH 7,2) hasta un volumen final de 650 μL . La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C y se paró la reacción con 80 μL de HCl 1N. Finalmente se añadieron 700 μL de lugol comercial (Panreac) diluido (1:6). Se hizo un blanco para cada muestra que contenía 100 μL de extracto y agua desionizada hasta un volumen final de 1430 μL . Se midió la absorbancia a 620 nm, para cada muestra a tiempo 0 y a los 30 min de incubación a 37°C. Para determinar las concentraciones de almidón en las muestras se realizó una curva de calibrado con soluciones que contenían de 0-100 μg de almidón. La cantidad de almidón hidrolizado se estimó mediante la diferencia de contenido de almidón a tiempo 0 y a los 30 minutos de incubación. La actividad α -amilasa se expresó como μg de almidón hidrolizado g^{-1} peso fresco minuto^{-1} . Se analizaron de 4 a 6 réplicas por tratamiento y cultivar.

5.2. Actividad superóxido dismutasa

La actividad SOD se estimó espectrofotométricamente mediante un método basado en la tasa de reducción del ferricitocromo *c* por los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) generados en el sistema xantina-xantina oxidasa (Mccord y Fridovich, 1969). Se añadieron 30 μ L de extracto a una solución que contenía 1 mL de solución generadora de radicales superóxido [KH_2PO_4 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM y xantina 0,1 mM; tras oxigenar esta solución durante 10 min se añadió ferricitocromo *c* 14 μ M], 20 μ L de KCN 0,5 mM, y 16 μ L de xantina oxidasa diluida (20 mL de xantina oxidasa (Sigma) en 800 μ L de KP 50 mM, pH 7,8), completando con KH_2PO_4 50 mM (pH 7,8) hasta un volumen final de 1230 μ L. Se hizo un blanco general y un blanco de cada muestra. La actividad SOD se determinó midiendo la reducción del ferricitocromo *c* a 550 nm, durante 1,5 min a 25°C. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir la reducción del ferricitocromo un 50% a 25°C. La actividad específica se expresó como unidades de SOD mg^{-1} de proteína. Se analizaron 4 réplicas por tratamiento y cultivar.

5.3. Actividad catalasa

La actividad catalasa (CAT) se estimó espectrofotométricamente mediante la descomposición del H_2O_2 a 240 nm, durante 1,5 min a 25°C, utilizando su coeficiente de extinción molar a 240 nm $\epsilon=39,4 M^{-1}cm^{-1}$ (Aebi, 1984). Se añadieron 15 μ L de extracto a la mezcla de reacción (H_2O_2 12 mM y KP 50 mM, pH 7,8) hasta completar 0,5 mL de volumen final. El blanco se realizó con la mezcla de reacción sin extracto. La actividad específica se expresó como μ moles de H_2O_2 catalizados $min^{-1} mg^{-1}$ de proteína. Se analizaron 4 réplicas por tratamiento y cultivar.

5.4. Glutación

El contenido de glutación total (GSH + GSSG) y su estado redox se determinó mediante el método descrito por Griffith (1980). Para ello se monitorizó la formación de glutación reducido (GSH) a partir de glutación oxidado (GSSG) por la actividad glutación reductasa (GR), mediante la derivatización del tiol con 5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzoico, midiéndose la variación de la absorbancia a 412 nm durante 1,5 min. Para cuantificar la cantidad de GSH+GSSG se utilizó un medio de reacción que contenía: 25 μ L de extracto (hojas o raíces), 20 μ L de GR (50 U/mL), 100 μ L de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) 6 mM, el volumen necesario de NADPH para tener una concentración final de 0,21 mM en el medio y KP 150 mM (pH 7,4) con EDTA 6,3 mM hasta completar el volumen final de reacción (1 mL). Para determinar la concentración de GSSG se derivatizaron 90 μ L de extracto con 6 μ L de vinilpiridina y 10 μ L de trietanolamina 98%

(v/v), pH 8, para bloquear los grupos tiol. Se agitó durante 30 s y se incubó a temperatura ambiente durante 25 min. Con el extracto ya derivatizado se procedió a la cuantificación descrita en el paso anterior. Como control se empleó un blanco general que contenía 25 μL de tampón de extracción en lugar de muestra. Los calibrados para determinar los contenidos de GSH+GSSG y GSSG se realizaron con GSH y GSSG en rangos de 0-4 nmol y 0-1 nmol, respectivamente. El contenido de GSH se calculó por diferencia entre el glutatión total y GSSG en las muestras, expresándose como nmoles g^{-1} peso fresco. Se analizaron 4 réplicas por tratamiento y cultivar.

5.5. Prolina

El contenido de prolina se determinó mediante el método descrito por Bates (1973). Para ello los extractos se mezclaron con una solución de ninhidrina ácida y ácido acético glacial (1:1:1). La mezcla se hirvió 1 h y la reacción se detuvo en hielo. La solución de ninhidrina ácida se preparó en oscuridad mezclando 30 mL de ácido acético glacial, 20 mL de ácido fosfórico 6 M y 1,25 g de ninhidrina. Para extraer el complejo cromóforo prolina-ninhidrina se añadieron 0,6 mL de tolueno y se agitó en vortex. Para separar la fase orgánica (que contiene el complejo cromóforo) se dejó reposar la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente. En la fase orgánica se determinó la absorbancia a 520 nm. Se realizó una recta de calibrado con L-prolina (0-50 μM) (Sigma) para calcular las concentraciones, expresándose como μmoles de prolina g^{-1} peso fresco. Se analizaron 4 réplicas por tratamiento y cultivar.

5.6. Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos se analizó mediante la determinación del contenido de malondialdehído (MDA), que es uno de sus subproductos (Singh *et al.*, 2007). Para ello se pulverizaron raíces y hojas, de manera independiente, en un mortero con nitrógeno líquido. Se homogeneizaron 250 mg de raíz y 100 mg de parte aérea con 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 0,1% y se centrifugaron a 10.000 g durante 20 min, recogiendo el sobrenadante. Se mezclaron 0,5 mL de sobrenadante con 1 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) al 0,5%, preparado en TCA al 20%. La mezcla se incubó a 95°C durante 30 min, tiempo durante el cual se forman los complejos MDA-TBA responsables del color. La reacción se paró en hielo y las mezclas se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 530 nm, sustrayéndose la absorbancia no específica a 600 nm. La cantidad de MDA se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La peroxidación de lípidos se expresó como nmoles de MDA g^{-1} peso fresco. Se analizaron de 4 a 6 réplicas por tratamiento y cultivar.

6. Contenido de clorofilas

El contenido de clorofilas se determinó mediante un medidor de clorofilas portátil CCM-200 plus (Opti-Sciences, Hudson, NH, EEUU) y los valores fueron normalizados en relación al control (ausencia de tratamiento).

7. Contenido de Hg, Cd y otros elementos

Para la determinación de Hg, Cd y otros elementos químicos, en el momento de la recolección las raíces y las partes aéreas fueron lavadas en Na₂EDTA 10 mM y posteriormente aclaradas dos veces en agua destilada. El contenido de mercurio se determinó directamente, mediante espectrometría de absorción atómica, utilizando un analizador de Hg AMA254 (LECO) (Millán *et al.*, 2006; Pérez-Sanz *et al.*, 2012). Como patrones de referencia se utilizaron los suelos CMR 050 (arcilla, $4,080 \pm 0,099$ mg kg⁻¹ de Hg) y CMR051 (suelo procedente de un área contaminada, USA, $29,90 \pm 5,96$ mg kg⁻¹ de Hg). Se analizaron 3 réplicas para cada variedad, tratamiento y tejido. Para determinar el contenido de Cd, K, Ca, Na, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn y Cu, el material se secó en una estufa a 60°C durante 3 días. La determinación se realizó mediante espectrometría de plasma utilizando un ICP-4300 DV (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EEUU), previa digestión con ácido nítrico-perclórico (7:3). Se utilizaron patrones de referencia certificados Certipur® (Merck).

Los factores de traslocación de Hg y Cd (TF) se calcularon para los diferentes cultivares, siguiendo la siguiente ecuación (Zhang *et al.*, 2006):

$$TF = C_M \text{ parte aérea} / C_M \text{ raíz, donde } C_M \text{ es la concentración de metal.}$$

8. Técnicas histoquímicas

La peroxidación de lípidos y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática se analizaron histoquímicamente como se describe en Yamamoto *et al.* (2001).

Tras realizar las tinciones, las raíces se observaron mediante una lupa binocular Zeiss Stemi 2000C y se fotografiaron mediante una cámara Leica modelo DFC420C. Para ambas determinaciones se analizaron 10 plantas por cultivar y tratamiento, estimándose la densidad de color mediante el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

8.1. Detección histoquímica de la peroxidación de lípidos

Para la determinación histoquímica de la peroxidación de lípidos el material fue incubado en reactivo de Schiff durante 20 min en oscuridad, coloreándose los aldehídos producidos por la peroxidación de lípidos. Las muestras se conservaron en una solución de sulfito (K₂S₂O₅ al 0,5% en HCl 0,1 N) que mantiene el color, hasta su observación en la lupa binocular. El reactivo de Schiff se preparó de acuerdo a Jensen (1962): 0,5 g de fucsina básica y 0,5 g de bisulfito sódico en 10 ml de HCl 0,1 N. La mezcla se agitó enérgicamente a intervalos de 15

min durante 2 h. Se añadieron 300 mg de carbón activo y se agitó la mezcla durante 5 minutos. La mezcla se filtró hasta que quedó transparente.

8.2. Detección histoquímica de la integridad de la membrana plasmática

Para la determinación histoquímica de la pérdida de la integridad de la membrana plasmática el material fue incubado en azul de Evans (0,025% (p/v) en CaCl_2 , 100 mM y pH 5,6) durante 10 min y lavado 3 veces con 200 mL de CaCl_2 , 100 mM y pH 5,6.

9. Técnicas moleculares

9.1. Extracción de RNA total

Las plántulas germinadas del cultivar tolerante a Cd (*CdT*; PI 516929) y del cultivar sensible (*CdS*; W6 6142), se aclimataron al sistema hidropónico miniaturizado durante 72 h y posteriormente se trataron con 0 ó 50 μM de CdCl_2 , disuelto en la solución nutritiva, durante 12 h. El mismo procedimiento se utilizó para la línea transgénica p18 y el *wild-type*.

Para el estudio de los patrones de expresión de miRNAs y sus genes diana en los cultivares *CdT* y *CdS*, las plántulas se sometieron a 0 ó 50 μM de CdCl_2 , disuelto en la solución nutritiva, recogién dose las raíces a 0, 6 y 10 h.

También se analizaron los patrones de expresión de los miRNAs correspondientes y sus genes diana en las plantas transgénicas de raíz, sometidas a 0 ó 75 μM de CdCl_2 , durante 7 días.

En todos los ensayos se utilizaron de 5 a 7 réplicas por cultivar y tratamiento, cada réplica conteniendo las raíces de 10 plantas. El material fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido. Todo el material congelado se almacenó a -80°C hasta su uso.

Todo el material fue pulverizado en un mortero con nitrógeno líquido de manera previa a la extracción. No se utilizaron más de 100 mg de muestra pulverizada en cada extracción. Una vez extraído, el RNA se almacenó a -80°C hasta su uso.

La extracción de RNA total se realizó utilizando el sistema comercial *RNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante. Durante el procedimiento, las muestras fueron tratadas con *RNase-free DNase I* (Qiagen) para eliminar el ADN genómico, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA fue resuspendido en 50 μL de agua MilliQ estéril libre de RNasas.

Para el estudio de miRNAs fue necesario realizar la extracción de manera manual utilizando el reactivo comercial TRIZol® (Invitrogen), puesto que los miRNAs se pierden mediante la extracción con kits comerciales de columnas. Para ello, el material pulverizado se homogeneizó con 1 mL de TRIZol®, incubándose la mezcla durante 7 min a 30°C . Se añadieron 0,2 mL de cloroformo y la mezcla se incubó durante 5 min a 30°C . Posteriormente

se centrifugó durante 5 min (13.000 g, 4°C), recogíendose la fase acuosa. Se añadió isopropanol al 100% (0,5:1 isopropanol:fase acuosa), incubándose durante 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó de nuevo durante 30 min (12.000 g, 4°C). Finalmente, se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* de RNA con 1 mL de etanol muy frío al 75%. El *pellet* se dejó secar al aire y una vez seco, el RNA fue resuspendido en 40 µL de tampón TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8 con HCl). El RNA se trató con *RNase-free DNase I* (Thermo Scientific Molecular Biology) siguiendo las especificaciones del fabricante.

De manera previa a su uso, se comprobó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotométricamente, utilizando un Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EEUU).

9.2. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA monocatenario, se utilizó el sistema comercial *1st Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche). El cDNA se obtuvo a partir de 1 µg de RNA total con la enzima transcriptasa reversa AMV (Roche) y oligo-p(dT)₁₅ como cebadores. La mezcla de reacción (20 µL) se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante y se incubó en un termociclador (25°C, 10 min; 42°C, 60 min; 95°C, 5 min; 4°C, 5min).

Para el estudio de miRNAs la síntesis de cDNA se realizó mediante el método de *Stem-Loop* (Kramer, 2011), que consiste en realizar la retrotranscripción utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente para cada miRNA (Tabla 7; Materiales y Métodos 10.1.). Para la síntesis del cDNA se utilizó 1 µg de RNA total (extraído con TRIZol[®]) con 1 µL de una mezcla de los oligonucleótidos específicos (1 µM), 1 µL de una mezcla dNTPs 10 mM y agua libre de RNasa hasta un volumen final de 13 µL. La mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos y posteriormente se mantuvo 1 min en hielo. Se añadieron 4 µL del tampón 5X *First-Strand* (Invitrogen), 1 µL de DTT 0,1M, 1 µL de *RNaseOUT*[™] (Invitrogen) y 1 µL de la enzima transcriptasa reversa *SuperScript*[™] III (200 ud/ µL) (Invitrogen) y se incubó a 55°C durante 60 min. La reacción se paró incubando la mezcla a 70°C durante 15 min.

9.3. Cuantificación de mRNAs y miRNAs mediante qRT-PCR

El análisis qRT-PCR se realizó con un equipo 7300 *Real-Time PCR Sequence Detection System* (PE Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU).

Los cDNAs obtenidos en la retrotranscripción fueron diluidos 50 veces, con excepción de los cDNAs obtenidos mediante la técnica de *Stem-Loop* para el estudio de miRNAs, los cuales fueron utilizados sin diluir.

La mezcla de reacción contenía 1 µL de cDNA, 5 µL de “SYBR® *Green Master Mix*” (Applied Biosystems) y 4 µL mezcla de oligonucleótidos específicos (directo y reverso) a 2,5 µM (Tablas 5 y 7; Materiales y Métodos 10.1.). El programa de PCR utilizado constó de un primer paso de activación de la polimerasa *AmpliTa q Gold*® DNA a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C 15s y 60°C 1 min, y finalmente se obtuvo una curva de disociación a 95°C 15s; 60°C 1min; 95°C 15 s, con la que se verificó la presencia de un único producto de amplificación.

Como control endógeno se utilizaron los genes *Mtc27* (Verdoy *et al.*, 2006) o *MtActin11* (actina) (Mhadhbi *et al.*, 2011) para normalizar los resultados. Para la cuantificación de los miRNAs, como control endógeno se utilizó U6 snRNA (*small nucleolar RNA*) (Szitty a *et al.*, 2008).

La expresión relativa se calculó mediante el método de Pfaffl (2001), teniendo en cuenta la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos, conforme a la siguiente expresión: $\text{ratio} = [(E_{\text{target}})^{\Delta C_t \text{ target}}] / [(E_{\text{endógeno}})^{\Delta C_t}]$, donde *E* es la eficiencia de amplificación específica de los oligonucleótidos $E = 10^{[-1/\text{pendiente}]}$.

Para cada ensayo se analizaron 4 réplicas biológicas (4 cDNAs procedentes de 4 extracciones de RNA independientes) con dos repeticiones técnicas de cada una.

9.4. Cultivo de microorganismos

Las células de *E. coli* DH5α se cultivaron en medio líquido Luria-Bertani (LB), conteniendo 10 g/L de bacto triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl (pH 7), a 37°C durante 24 h. En el caso de las células transformadas, se añadieron 100 µg/mL de estreptom icina y kanamicina al medio líquido y las bacterias crecieron a 37°C durante 24 h. La selección de las células transformadas se hizo en placa de Petri con medio LB sólido con 100 µg/mL de estreptom icina y kanamicina, sobre el que se habían extendido 40 µL de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 100 mM y 40 µL de 40 mg/mL de X-Gal en *N,N*-dimetilformamida. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

Las células de *Agrobacterium rhizogenes* ARqual se cultivaron en LB a 28°C durante 2 días. La selección de las células de *A. rhizogenes* transformadas con el inserto de interés correspondiente se hizo en placa de Petri con LB al que se añadió bacto-agar al 1,5% (p/v) y 50 µg/mL de estreptom icina y kanamicina. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 h.

9.5. Plásmidos recombinantes y su transferencia a *A. rhizogenes*

Los *A. rhizogenes* conteniendo los plásmidos con los insertos de interés fueron proporcionados por el grupo *Regulatory RNAs* del Institut des Sciences du Végétal-CNRS (Gif-sur-Yvette, Francia).

Para estudiar el papel de nmiR3 en el estrés por Cd se utilizaron dos construcciones genéticas diferentes; una construcción que lo inactivaba y otra que lo sobreexpresaba, ambas bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV.

Para bloquear la actividad de nmiR3, la construcción se realizó mediante la técnica *mimicry* (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007). Esta técnica está basada en aprovechar la secuencia del gen *IPS 1* (*Induced by Phosphate Starvation 1*) que contiene una secuencia complementaria al miR399. Cuando el gen *IPS 1* se transcribe, reconoce la secuencia del miR399 y se une a él, obteniéndose en la parte central de la hebra correspondiente a *IPS 1* un bucle (tres bases desapareadas). Este bucle hace que el complejo sea resistente a la degradación guiada por el miR399 y este quede secuestrado por el *IPS 1*.

Para hacer uso de este concepto, la secuencia complementaria al miR399 que contiene el gen *IPS 1*, es sustituida por la secuencia que complementa con el miRNA que se desea inactivar o bloquear. Tras diseñar la construcción, esta se obtuvo comercialmente, integrada en un vector transitorio pENTR/D-TOPO (Invitrogen), listo para transformar *E. coli*.

La construcción de sobreexpresión contenía el fragmento correspondiente al precursor del nmiR3. Esta construcción fue obtenida a partir de DNA genómico de *M. truncatula* cv. A17, mediante amplificación por PCR, con oligonucleótidos específicos que contenían secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. El producto amplificado se introdujo en el vector transitorio pENTR/D-TOPO (Invitrogen,) mediante ligación.

Los plásmidos recombinantes fueron introducidos, mediante choque térmico, en células competentes de *E. coli* DH5. Se verificó por secuenciación que no se introdujo ningún cambio en dos clones positivos para cada construcción.

Los plásmidos obtenidos carecían de secuencia del promotor constitutivo 35S CaMV, por lo que mediante restricción (utilizando los sitios de restricción de *Bam*HI y *Eco*RI) y ligación, las construcciones fueron clonadas en el vector definitivo pMF2, conteniendo el promotor constitutivo 35S CaMV y resistencia a la kanamicina (Figura 9).

Finalmente, los plásmidos recombinantes fueron introducidos por electroporación en células competentes de *A. rhizogenes* ARqual, verificándose de nuevo las construcciones mediante secuenciación.

9.6. Transformación estable de raíces de *M. truncatula* cv. Jemalong

Las semillas de *M. truncatula* cv. Jemalong se esterilizaron y germinaron durante 32 h como se describió en la sección 2.2 de Materiales y Métodos. Los hipocotilos de las plantas fueron seccionados dejando aproximadamente 1 cm de radícula desde la base del cotiledón, y se inocularon haciendo pasar el punto de sección por un cultivo en sólido con *A. rhizogenes*

A) RS--BamHI-5'GCCGTAGCCGGCAGATCTTCTCCCTCTAGAAAACTGTGATTAGCTCCCTGATTAAAGCTTCGGTTTTCTCTTTGGAAACTGTGATTAGCTCCCTGATTAAATTTTCAATTTTTTGTGGAAACTGTGATTAGCTCCCTGATTAAATTTGATGGACTCGAGGCCGTAGCCGGC-3'-EcoRI--RB

B) RS--BamHI-5'-ATGATCCAACAAATTTCTTTAATCAAGGAAAAACACAGTGGAGAAAGATGAAGGAAGTGAGAGTAATCTCAAACTCTTAACTGTGATTTCCTGATTAAAAAATTCAATAGATCAA3'-EcoRI--RB

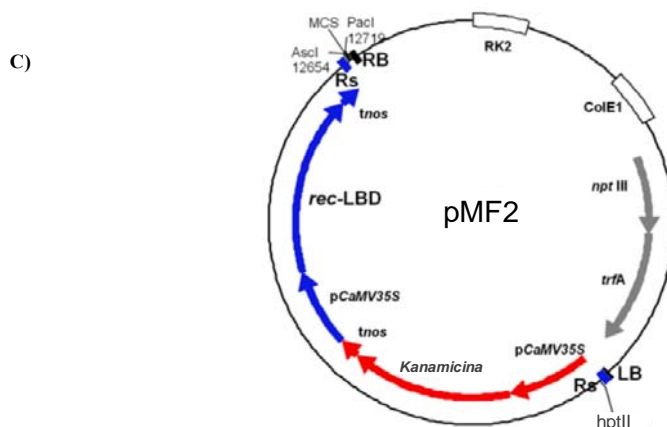


Figura 9. Secuencia para la construcción de inhibición de la actividad de nmiR3, MIM3 (A), Secuencia para la construcción de sobreexpresión del nmiR3, nmiR3OE (B) y mapa del vector binario definitivo pMF2 (C). RB, extremo derecho; LB, extremo izquierdo; RS, sitio de recombinación; MCS, sitio de clonaje múltiple.

ARqual portando el vector con el inserto de interés. Los hipocotilos inoculados se transfirieron a una placa de Petri cuadrada de 12 x 12 x 2 cm, conteniendo medio sólido Fahraeus modificado (Tabla 4), con kanamicina (20 mg/L concentración final). Se transfirieron para cada placa un máximo de 16 plantas distribuidas en dos filas, y se colocaron con un ángulo de 45°, selladas con Parafilm® (Ted Pella, Redding, EEUU), en cámara de crecimiento, a una temperatura constante de 20°C, 65% de humedad relativa, un fotoperiodo de 16 horas de luz/día y una intensidad luminosa de $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Tras una semana de incubación, las placas fueron transferidas a 65% humedad relativa, 25°C día / 19°C noche, 16 horas de luz/día e intensidad luminosa de $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Posteriormente, las plantas con raíces transformadas se transfirieron a nuevas placas, colocando un máximo de 8 plantas por placa, esta vez conteniendo papel de filtro previamente autoclavado para evitar que la raíz penetrase en el agar y para mantener la humedad. Las placas se sellaron con Micropore™ y se incubaron bajo las mismas condiciones que en el paso anterior durante una semana más, tras la cual las plantas estaban listas para ser sometidas a los diferentes tratamientos. En la Figura 10 se puede observar un esquema del procedimiento completo de transformación de raíces.

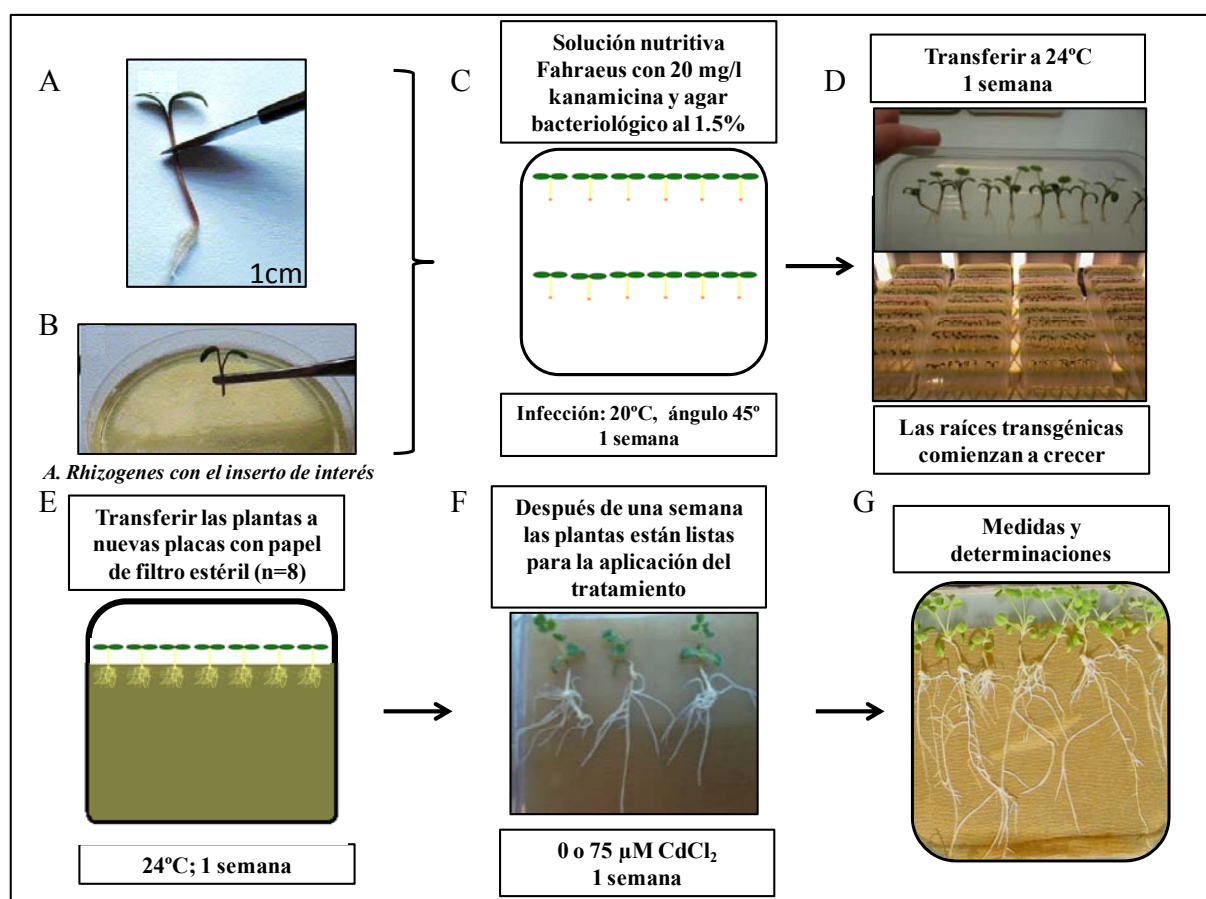


Figura 10. Procedimiento completo de transformación y generación de raíces transgénicas de *M. truncatula* cv. Jemalong y su posterior tratamiento. Seccionado de hipocótilos (A), inoculación (B), infección (C), crecimiento de raíces transgénicas (D), selección de las raíces debidamente transformadas (E), crecimiento en placa con papel de filtro y aplicación del tratamiento (F) recolección y determinaciones (G).

10. Técnicas bioinformáticas

10.1. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para la cuantificación por *Real-Time* PCR de los mRNAs de los genes de interés (Tabla 5) fueron diseñados mediante el software Primer Express (PE Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU), para obtener productos de PCR de aproximadamente 100 bp.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada miRNA (Tabla 6), necesarios para la retrotranscripción y cuantificación (Tabla 7), mediante el método de *Stem-Loop* (Kramer, 2011) detallado en la Figura 11.

Los oligonucleótidos para la retrotranscripción de los miRNAs están formados por la secuencia universal “GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACG AC” seguida de la secuencia reversa complementaria de los últimos 6 nucleótidos del miRNA maduro. Siguiendo con el procedimiento de *Stem-Loop*, los oligonucleótidos directos

utilizados en la cuantificación de los miRNAs, mediante qRT-PCR, están formados por la secuencia “GCGGCG” seguida de la secuencia de los miRNAs maduros, sin contar los últimos 6 nucleótidos. Como cebador reverso siempre se utilizó un oligonucleótido universal de secuencia “GTGCAGGGTCCGAGGT”.

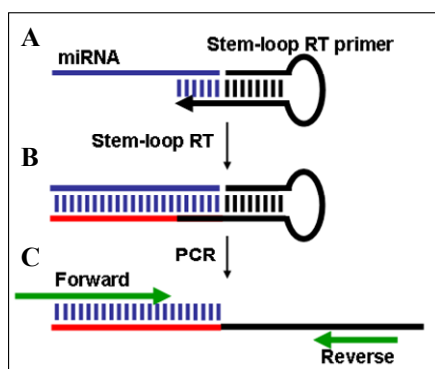


Figura 11. Esquema del método de *Stem-Loop* (Extraído de Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007). La porción correspondiente al oligonucleótido, para la retrotranscripción mediante Stem-Loop, se une al extremo 3' del miRNA (A), inicio de la retrotranscripción (B). Finalmente el producto de la retrotranscripción es amplificado con un oligonucleótido específico (forward o directo) y un oligonucleótido universal (reverso) (C).

10.2. Secuencias y alineamientos

Las secuencias correspondientes a los genes estudiados fueron obtenidas a partir de la base de secuencias del European Molecular Biology Laboratory (EMBL; www.embl.de/), de la base de datos de secuencias GeneBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), de *Medicago truncatula* Genome Project (www.jcvi.org/medicago/) y de *Medicago truncatula* Hapmap Project (US National Science Foundation; www.medicagohapmap.org).

Para el estudio de los miRNAs se utilizaron además la base de datos de miRNAs de *M. truncatula* MIRMED (<http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/RNA/MIRMED>) y la base de datos de miRNAs miRBase (www.mirbase.org/search.shtml).

11. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

11.1. Análisis generales

Para determinar si el número de cultivares de *M. truncatula* usados en el *screening* de tolerancias fue el apropiado, se analizó la distribución de frecuencias de los RRGs obtenidos.

Los incrementos de longitud de las raíces observados en el *screening* fueron analizados mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$; $n \geq 10-30$) y aquellos cultivares que no mostraron diferencias significativas o que crecieron más en presencia de metal, en comparación con su control, fueron considerados como potencialmente tolerantes a Hg y/o Cd.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para los análisis de expresión génica.

Gen	Directo 5'-3'	Reverso 5'-3'	Identificador
<i>MtACTIN11</i>	GGTCCATCAATTGTCCACAG	ATGCTTCTGGCTGATTACA	XM_003621972
<i>Mtc27</i>	CACCCAACTAGATGCAGAGAAACA	CAAAGAATTGAAGGTCCTTGAGC	TC85136
<i>MtCuZnSODa</i>	TGGTTGGCTTGACTCCAGTA	AATGGCAGTAGCCCATCAAG	Medtr4g057240.1
<i>MtCuZnSODb</i>	CTCACCGGACCAAACTCAAT	AGCTACTCTGCCACCAGCAT	Medtr7g114240.3
<i>MtCuZnSODc</i>	GAAGGGCTGTCGTTGTTCAT	TCCAATGATACCGCATGCTA	Medtr6g029200.2
<i>MtFeSOD</i>	TCAATTCCAAATTACTGACTTTGTG	ATATTCAGGACGCCGATTCT	Medtr1g048990.2
<i>MtMnSOD</i>	TAAAGTGCTGCTTGGTGTGG	CTGCGCCCTAAGGAAAGTCT	Medtr3g094250.1
<i>CAT</i>	GCACCCGACAGGCAAGATAGATT	CGAGTCACGTACATGGAGTTTA	(Mhadhbi <i>et al.</i> , 2011)
<i>MtCYS</i>	TCCTCTGTGCTATTTGAGTCAGTGA	AATGATTCAAGGGCTCGAAAGTC	XM_003610676
<i>MtγECS</i>	GCGTCTTGCTTTTCTTTCACATT	TTCTACCCAAAAAAGGTGGCTTAT	AF041340.1
<i>MtGSHS</i>	CATTACCATTGAGCCTCCTGTT	TGTGGCCTCCCTTTCAATTT	XM_003626276.1
<i>MthGSHS</i>	CACATGATGAAACCAACTCATTGA	AACATGTCATGGGAGAAAGTAAAAGA	AF194421.1
<i>MtPCS</i>	ATCTCGTGCTCCTTCCTCT	CAGAAGCAGAATTTTGGTGAC	Medtr7g097190.1
<i>MtGPX</i>	CCAACAACCTCTCCTTTTCAAATT	CTCTGATTTTGCTCATTCTGAATAT	XM_003588826.1
<i>MtGR</i>	CCCAAGACGAATTTGTAAACACAT	CCCAATAAAAGAAACATACAAACAAGTC	BT149819.1
<i>MtMR</i>	CTACAGCTGGGGTCGTTCTT	AAGCCCTTAACCACAAATCG	Medtr7g034715.1
<i>MtGalLDH</i>	CTCCAAGCAAGGCTGAGAAA	GCTTTTCCAACCTGTTGTTTCG	Medtr1g050360.2
<i>MtG6PDH</i>	ACAAGCCGGGAAGTAGAGGT	TGGTCACTCTATAAGGTAGGAGGAA	Medtr7g037440.1
<i>Mt6PGDH</i>	CGAGACTACTTCGGTGCTCA	TCTAAATCCTCGACTGCTTGG	Medtr7g017900.2
<i>MtICDH</i>	TGGCTGCTGATCTTAAACAAA	TGCTTCGTTCCCTTTCTTA	Medtr5g077070.1
<i>VaP5CS</i>	GCAAAAGTTGATTATCCGGCAG	TTCGAAGGTCAAGAATGATCTCC	M92276
<i>MtP5CS1</i>	TTAATTGAGAGAAATGATGATAATTGC	CAATTCCTAAGTTGGGAAGGAAAC	Medtr3g069080.1
<i>MtP5CS2</i>	CGGTAGGAGTCGAGGGCTTGTT	TTGTGTGTATAAATCATACTTCGATCG	Medtr7g063650.1
<i>MtP5CR</i>	GGGTTTCCGTGGAATACTGA	TCGAATTTTCGCTTAGAAATCA	Medtr7g090160.1
<i>MtProDH</i>	AGGGATTGGAAGGTGAACCA	CCCTGCATTGCTCAAAGCA	Medtr7g020820.1
<i>MtP5CDH</i>	ATGATTATGGACCGGTATCAAAG	GGACATACTAGTCTCGCCGTCT	Medtr4g107940.1
<i>MtOAT</i>	GCAGTTGCCATTGCCTCACT	AGCAGACCGAGAAGCTCACC	Medtr7g451450.1
<i>ProT</i>	ACAGAAGGGCGGCCTCTG	TTGGAGTCTACTGCAATGAGCC	Medtr3g069960.3
<i>MtPUS</i>	AGCAAACCAGTTCAGGAGA	GCCTGTGCAATAGCCTCTTC	Medtr1g095580.1
<i>MtATFP4</i>	TCTAGTGTTCTCATTACCCTGTG	CCTCTGTTTTTCATTATTTACCATGC	Medtr1g041690.1 /Medtr3g082260.1
<i>MtPDS5</i>	ACATCAGGTGATGCCATGAA	TGATAAGCAGAAGGCAAGCA	Medtr3g106100.1
<i>MtPRTF</i>	AAGCGTGAAGAAGGCAGAAG	CACCTGCACAAGTGAAGTAA	Medtr7g012295.1
<i>MtGDSL</i>	GAACGGGCAAGAGTGTTC	GCATCCAAGTTCCCTTCTT	Medtr8g012460.1

Actina (ACTIN11); Mtc27 (homologo de alfalfa Msc27); Superóxido dismutasa (SOD); Catalasa (CAT); Cisteína sintasa (CYS); γ- glutamylcisteína sintetasa (γECS); Glutación sintetasa (GSHS); Homoglutación sintetasa (hGSHS); Fitoquelatina sintasa (PCS); Glutación peroxidasa (GPX); Glutación reductasa (GR); Monodehidroascorbato reductasa (MR); Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH); Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH); Isocitrato deshidrogenasa (ICDH); Vigna aconitifolia pirrolina-5-carboxilato sintetasa (VaP5CS); Δ¹-pirrolina-5-carboxilato sintetasa 1 (MtP5CS1); Δ¹-pirrolina-5-carboxilato sintetasa 2 (MtP5CS2); Pirrolina-5-carboxilato reductasa (MtP5CR); Prolina deshidrogenasa (ProDH); Δ¹-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (MtP5CDH); Ornithina δ-aminotransferasa (MtOAT); Transportador de prolina (ProT); Pseudouridina sintasa (MtPUS);

Proteína de unión a iones metálicos ATFP4 (MtATFP4-LP); Proteína de cohesión de cromátidas PDS5 (MtPDS5-A); Factor de transcripción relacionado con la patogénesis (MtPRTF); GDSL esterasa/lipasa (MtGDSL).

Tabla 6. miRNAs utilizados en el estudio, procedentes de una librería miRNAs de ápices de raíces de *M. truncatula* expuesta a diferentes condiciones ambientales (Formey *et al.*, 2014).

smRNA	ID miRBase	Familia	Secuencia miRNA maduro
U6 snRNA	CU013524.5 (GeneBank)		CGGGGACATCCGATAAAATTGG
nmiR-1	mtr-miR5037a	5037	AACCCTCAAAGGCTTCCACGG
nmiR-2	mtr-miR7696b-3p	7696	TTGAATTATGAGAACTTGAAG
nmiR-3	EVSUSMY01EAALD	1509	TTAATCAGGGAAATCACAGTT
nmiR-4	EVSUSMY01B76KK	2111	TAATCTGCATCCTGAGGTGTA
nmiR-5	E4D3Z3Y01BHN7L	2089	TTACCTATTCCACCAATTCCA
nmiR-6	mtr-miR2612a	2612	TGATAGTGTCAACTAGTACAG
nmiR-7	mtr-miR2088b	2088	TCCAATGTAATCTAGGTCTAC

Tabla 7. Oligonucleótidos diseñados para la retrotranscripción y la cuantificación de los miRNAs mediante *Stem-Loop*.

smRNA	Oligonucleótidos RT	Oligonucleótidos qRT-PCR
U6 snRNA	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCAATT	GCGGCGCGGGGACATCCGATAA
nmiR-1	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCGTGG	GCGGCGAACCCTCAAAGGCTT
nmiR-2	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTTCAA	GCGGCGTTGAATTATGAGAAC
nmiR-3	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACTGT	GCGGCGTTAATCAGGGAAATC
nmiR-4	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTACACC	GCGGCGTAATCTGCATCCTGA
nmiR-5	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGGAAT	GCGGCGTTACCTATTCCACCA
nmiR-6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTGTAC	GCGGCGTGATAGTGTCAACTA
nmiR-7	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTAGACC	GCGGCGTCCAATGTAATCTA

Se realizó un análisis de correlación de Pearson comparando los RRGs obtenidos en el *screening* con los datos obtenidos por otro estudio de tolerancia a aluminio realizado para los mismos cultivares (Sledge *et al.*, 2005).

Los datos relativos a los parámetros fisiológicos y de crecimiento, contenido de metales, contenido mineral, germinación, actividades enzimáticas y contenido de metabolitos fueron analizados mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y se utilizó el test de Fisher LSD o el test de Tukey para comparación por parejas, en función de los requerimientos de cada análisis.

Respecto a los estudios de expresión génica, solo se consideraron relevantes las variaciones de expresión de 2 o más veces.

11.2. Análisis factorial (PCA) y generación de índices de tolerancia

Considerando los diferentes cultivares como réplicas de cultivares potencialmente tolerantes o sensibles, se utilizaron los parámetros relativos para realizar un análisis factorial mediante el método de componentes principales (PCA), con el objetivo de identificar los principales responsables de la varianza observada.

Los componentes resultantes (PC1 y PC2) fueron representados en un gráfico de dispersión para detectar asociaciones.

En función de los componentes observados, se calculó un índice de tolerancia (TI) para cada cultivar de acuerdo a la siguiente expresión:

$$TI = [\sum ((VPC1) RX) / 100] \%VarPC1 + [\sum ((VPC2) RX) / 100] \%VarPC2$$

Donde RX representa el parámetro relativo X, VPC representa el peso o valor propio para cada parámetro relativo en una componente (PC) y %VarPC representa el porcentaje del total de la varianza explicada por esa componente.

Los valores obtenidos de TI se normalizaron (nTI) dividiendo por el máximo TI observado para los cultivares analizados.

Finalmente se realizó un análisis de la varianza con los parámetros relativos, mediante ANOVA multivariante ($p < 0.05$; $n \geq 10$), considerando los diferentes cultivares como réplicas de los cultivares tolerantes o los sensibles, conforme a la clasificación de tolerancias obtenida mediante TI. Se utilizó el test de Fisher LSD para la comparación por parejas entre los cultivares tolerantes y sensibles.

IV. Resultados

IV. RESULTADOS

1. Estudio de la tolerancia a Hg y Cd e identificación de cultivares tolerantes en una colección de germoplasma de *M. truncatula*

1.1. Desarrollo de una metodología para el *screening* rápido de tolerancia a Hg y Cd en *M. truncatula*

Para el estudio e identificación de variedades tolerantes a Hg y Cd fue imperativo el desarrollo de un método de *screening* fiable, que permitiera evaluar de manera rápida y poco costosa la tolerancia a estos metales en un gran número de cultivares de *M. truncatula*. Para ello se puso a punto un sistema hidropónico miniaturizado (Figura 6), con el que se evaluó la tolerancia a Hg y a Cd en plántulas de *M. truncatula* (Gaertn.) cv. Parabinga expuestas a diferentes concentraciones de Hg (0-7 μM HgCl_2) ó de Cd (0-40 μM CdCl_2), durante 48, 72 y 96 h (Figura 12). El crecimiento de las radículas se midió antes y después de los tratamientos y se expresó como crecimiento relativo de raíz calculado respecto al control en ausencia de metal (*Relative Root Growth*, RRG).

Ambos metales provocaron un efecto negativo en el crecimiento de la radícula, siendo mayor conforme aumentaba su concentración. Para la realización de los experimentos de *screening* de tolerancia se seleccionaron como apropiadas las concentraciones de 4 μM HgCl_2 y 10 μM CdCl_2 a las 48 h de exposición, donde se observó un claro efecto negativo en las plantas pero sin paralizar por completo el desarrollo de las raíces (RRG \approx 30%).

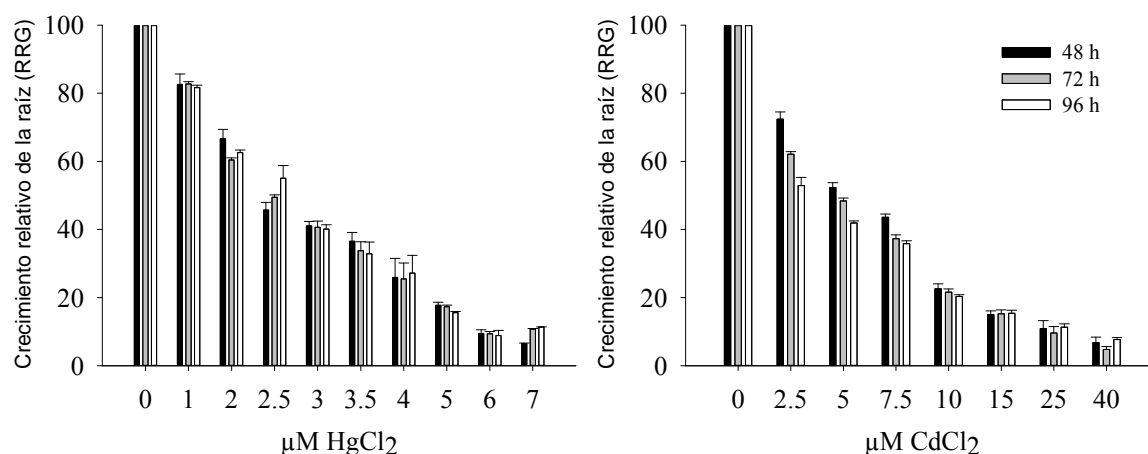


Figura 12. Crecimiento relativo de la raíz en plántulas de *M. truncatula* cv. Parabinga sometidas a diferentes concentraciones de Hg o de Cd. Se muestran los valores promedio y el error estándar (n = 10-30).

1.2. *Screening* de tolerancia a Hg y a Cd en una colección de germoplasma de *M. truncatula*

Para evaluar la tolerancia a Hg y a Cd e identificar cultivares potencialmente tolerantes a estos metales se realizó un *screening* de tolerancia en una colección de 258 cultivares de *M. truncatula*, procedentes del Sistema Nacional de Germoplasma Vegetal del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (NPGS).

Para ello, las plántulas fueron expuestas a 4 μM HgCl_2 ó 10 μM CdCl_2 en la solución nutritiva, durante 48 h, en el sistema hidropónico miniaturizado. Se midieron las longitudes de las radículas antes y después de aplicar el tratamiento y se calcularon los RRGs para cada cultivar referidos al incremento de la longitud de raíz en la solución nutritiva carente de metal (Tabla suplementaria 1).

Los 258 cultivares tratados con los metales mostraron una respuesta muy variada. Los RRGs se ajustaban a una distribución de frecuencias normal (Figura 13) lo que indica que las condiciones utilizadas para el ensayo y el número de cultivares testados fueron adecuados.

La mayoría de los cultivares mostraron elevada sensibilidad a los metales en las condiciones de ensayo, con valores de RRG entre 0% y 50% en 215 cultivares para Hg y en 224 cultivares para Cd. Se observaron RRGs entre 50% y 100% en 41 cultivares para Hg y en 33 cultivares para Cd y tan solo 3 cultivares mostraron valores de RRG $\geq 100\%$, 2 cultivares en exposición a Hg y 1 cultivar en exposición a Cd.

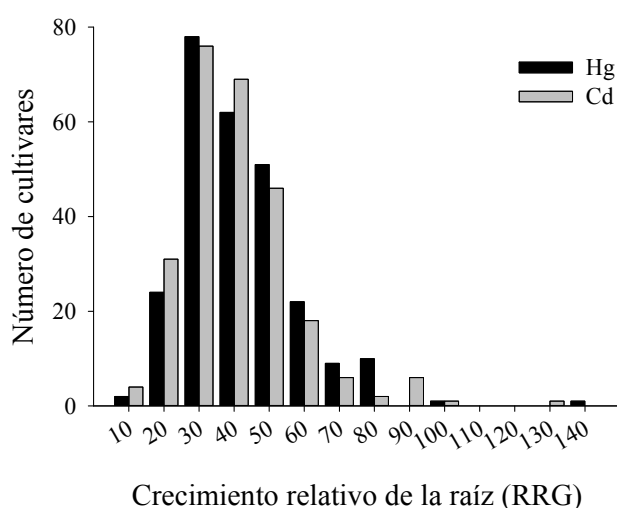


Figura 13. Distribución de frecuencias de los crecimientos relativos de la raíz, observados para 258 cultivares de *M. truncatula*, después de 48 h de exposición a Hg o Cd.

Mediante un análisis de varianza (ANOVA de una vía, $p < 0,05$, $n \geq 10$) de los incrementos de raíz de cada uno de los cultivares, se observó que no existían diferencias significativas entre el crecimiento de las radículas en presencia y ausencia de los metales para 5 cultivares expuestos a Hg y 4 cultivares expuestos a Cd (Tabla 8); y por tanto, estos cultivares podrían considerarse como potencialmente tolerantes a Hg y/o Cd. Además, el cultivar W6 6019 mostró un crecimiento de raíz significativamente mayor en presencia de Hg (RRG=141,7%) y no redujo su crecimiento de manera significativa en presencia de Cd (RRG=83,3%). PI 535619 mostró un crecimiento significativamente mayor en presencia de Cd (RRG=122,9%).

Tabla 8. Crecimiento relativo de la raíz (RRG) e incremento de longitud de la raíz en presencia o ausencia de Hg o Cd para los diez cultivares de *M. truncatula* considerados como potencialmente tolerantes. En Δ longitud raíz se indica la media \pm la desviación estándar.

Cultivar	RRG	Δ Longitud raíz (cm)		Cultivar	RRG	Δ Longitud raíz (cm)	
		Hg	Control			Cd	Control
W6 6019	141,7*	1,70 \pm 0,23	1,20 \pm 0,11	PI 535619	122,9*	1,43 \pm 0,15	1,16 \pm 0,05
W6 6107	100,0	1,60 \pm 0,31	1,60 \pm 0,23	PI 516933	90,0	1,13 \pm 0,15	1,25 \pm 0,12
W6 5992	79,4	1,80 \pm 0,30	2,26 \pm 0,60	PI 516929	85,9	1,32 \pm 0,20	1,53 \pm 0,13
W6 6023	77,9	1,32 \pm 0,20	1,70 \pm 0,50	PI 535622	84	0,53 \pm 0,09	0,62 \pm 0,11
W6 6020	65,3	1,06 \pm 0,32	1,63 \pm 0,15	W6 6019	83,3	1,00 \pm 0,18	1,20 \pm 0,11
W6 6042	58,1	0,50 \pm 0,08	0,86 \pm 0,37	W6 6023	66,2	1,13 \pm 0,10	1,70 \pm 0,50

* Diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía, $p \leq 0,05$, $n \geq 10$).

Con el objetivo de identificar patrones comunes de tolerancia o toxicidad a los metales, se realizó un análisis de correlación de Pearson comparando los resultados obtenidos para Hg y Cd en este estudio e incluyendo los resultados obtenidos previamente por Sledge *et al.* (2005) para los mismos cultivares expuestos a aluminio (Al). No se encontró ninguna correlación significativa entre Hg y Al ($r = 0,012$; $p < 0.01$; Figura 14A) o entre Cd y Al ($r = 0,096$; $p < 0.01$; Figura 14B), lo que podría indicar que los mecanismos que participan en la respuesta de tolerancia o toxicidad a Al y a Hg/Cd no son comunes.

Por el contrario, el análisis mostró una correlación significativamente positiva entre Cd y Hg ($r = 0,486$; $p < 0.01$; Figura 14C), indicando que los mecanismos que participan en la respuesta de tolerancia o toxicidad a Hg y a Cd podrían ser comunes o al menos estar relacionados.

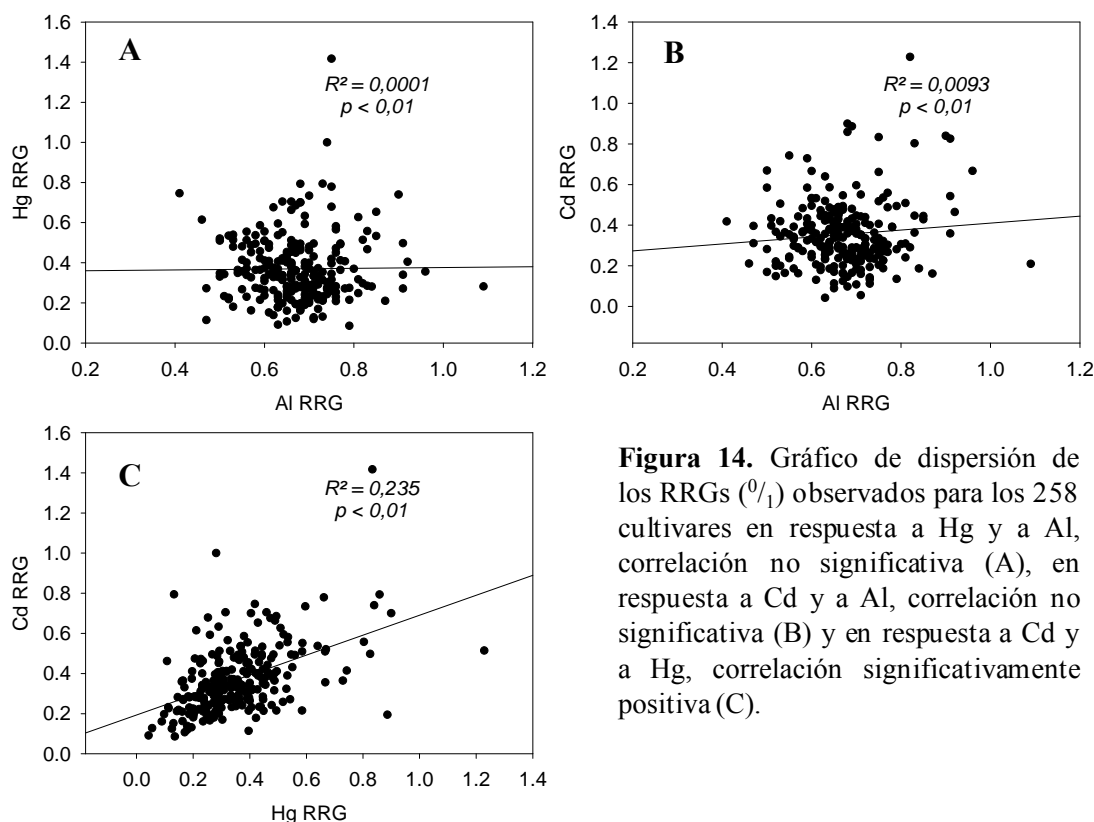


Figura 14. Gráfico de dispersión de los RRGs ($^0/1$) observados para los 258 cultivares en respuesta a Hg y a Al, correlación no significativa (A), en respuesta a Cd y a Al, correlación no significativa (B) y en respuesta a Cd y a Hg, correlación significativamente positiva (C).

1.3. Validación del *screening* en sobres de cultivo hidropónico

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos en el *screening* de tolerancias y para determinar si este método era realmente apropiado para la identificación de cultivares tolerantes de *M. truncatula* a Hg y a Cd, se realizaron ensayos en sobres de cultivo hidropónico.

En primer lugar se procedió a la selección de las condiciones óptimas para el desarrollo de los ensayos utilizando plántulas de *M. truncatula* (Gaertn.) cv. Parabinga, expuestas a diferentes concentraciones de Hg (0-40 μM HgCl_2) o Cd (0-200 μM CdCl_2), durante 20 días. Se determinaron los pesos frescos y secos de la raíz y de la parte aérea (Figura suplementaria 1), normalizándose los datos con respecto al control (ausencia de metal).

Los metales afectaron negativamente a los parámetros estudiados conforme aumentaba la concentración, seleccionándose las siguientes concentraciones como óptimas para el desarrollo de los experimentos: para Hg, 0 y 20 μM HgCl_2 y para Cd, 0 y 100 μM CdCl_2 .

Para los experimentos de validación se seleccionaron 4 cultivares potencialmente tolerantes a Hg (W6 5992, W6 6019, W6 6023 y W6 6107), con diferentes grados de

tolerancia (RRG entre 78% y 142%), 4 cultivares potencialmente tolerantes a Cd (PI 516929, PI 516933, W6 6019 y W6 6023), con RRG entre 66% y 90%, y 4 cultivares sensibles a ambos metales (PI 199257, PI 384634, PI 516950 y W6 6142) con RRG entre 9% y 29% para ambos metales. Los cultivares seleccionados fueron expuestos a Hg (20 μ M HgCl₂) o a Cd (100 μ M CdCl₂) durante 12 días, tiempo suficiente para producir cambios substanciales no letales. Se midió al final del experimento el número de hojas, la longitud de la raíz principal y los pesos frescos y secos de la raíz y de la parte aérea. Los valores fueron normalizados con respecto a su control (cada cultivar crecido en ausencia de metal) (Tabla 9).

La exposición a Hg disminuyó significativamente el número relativo de hojas (RNL) en 3 cultivares sensibles (< 85%). Sin embargo, todos los cultivares potencialmente tolerantes mostraron valores de RNL superiores o iguales a 100%, e incluso W6 6019 llegó a doblar el número de hojas producidas durante la exposición a Hg. Además, todos los cultivares potencialmente tolerantes produjeron RNLs significativamente superiores a los RNLs producidos por los cultivares sensibles. El crecimiento relativo de la raíz (RRG) disminuyó significativamente en todos los cultivares en presencia de Hg, independientemente de su categoría de tolerancia, a excepción del cultivar W6 6142, que no varió significativamente su RRG en presencia de Hg (93,61%).

El tratamiento con Hg también redujo de manera significativa el peso fresco relativo de la raíz (RRFW) en 3 cultivares sensibles y en un cultivar potencialmente tolerante, pero no produjo efecto significativo en el resto de cultivares. Sin embargo, los tres cultivares potencialmente tolerantes que no vieron afectado su RRFW mostraron valores superiores de este parámetro (de 94% a 112%) a los alcanzados por los cultivares sensibles (< 91%). En el caso del peso seco relativo de la raíz (RRDW), tan solo dos cultivares fueron afectados significativamente en presencia de Hg, el cultivar W6 6142, que mostró una reducción del 40% y el cultivar W6 5992, que mostró un incremento del 14% en presencia de Hg. Adicionalmente, todos los cultivares potencialmente tolerantes mostraron RRDWs significativamente superiores (de 102% a 122%) a los observados para los cultivares sensibles (de 95% a 60%). Con respecto a los parámetros de la parte aérea, tanto el peso fresco relativo (RSFW) como el seco relativo (RSDW) mostraron tendencias similares, observándose en todos los cultivares potencialmente tolerantes un RSFW significativamente mayor (de 103% a 131%) que en todos los cultivares sensibles (de 76% a 94%) y RSDWs significativamente superiores (de 115% a 130%) a los alcanzados por los sensibles (de 81% a 102%). Todos los cultivares vieron afectada

negativamente su relación peso raíz/ peso parte aérea (R/S) por la exposición a Hg. Sin embargo, el cultivar W6 6019 alcanzó un valor de R/S significativamente superior (71%) al resto de cultivares (<54%).

En los experimentos de verificación con Cd, el número relativo de hojas (RNL) decreció significativamente en todos los cultivares sensibles expuestos a Cd y por el contrario, este parámetro no varió significativamente en los cultivares potencialmente tolerantes expuestos a Cd, que mostraron valores de RNL significativamente superiores ($\geq 86\%$) a los observados en los cultivares sensibles ($< 68\%$). El tratamiento con Cd afectó negativamente el RRG en todos los cultivares, independientemente de la categoría de tolerancia. Sin embargo, todos los cultivares potencialmente tolerantes mostraron RRGs significativamente superiores (entre 40% y 42%) a los observados en los cultivares sensibles (entre 29% y 35%), a excepción del cultivar W6 6142 (RRG de 41%). El peso fresco relativo de la raíz (RRFW) disminuyó significativamente en presencia de Cd en todos los cultivares, aunque todos los cultivares potencialmente tolerantes mostraron RRFWs significativamente superiores (entre 44% y 59%) a los de los cultivares sensibles, a excepción del cultivar potencialmente tolerante PI 516933 y del cultivar sensible PI 516950. El Cd no produjo ningún efecto significativo en el peso seco relativo de la raíz (RRDW) de los cultivares, independientemente de la categoría de tolerancia, salvo en el cultivar W6 6142, donde el RRDW se redujo significativamente en presencia de Cd (73%). Tampoco se observó ningún efecto del Cd sobre el peso fresco relativo de la parte aérea (RSFW) para 3 de los cultivares potencialmente tolerantes (PI 516926, W6 6019 y W6 6023) y para el cultivar sensible PI 516950. El resto de cultivares sufrieron una disminución significativa de su RSFW en presencia de Cd. Además PI 516929 y W6 6019 mostraron RSFWs significativamente superiores (88% y 100%) al resto de cultivares (<78%). Tan solo dos cultivares redujeron significativamente el peso seco relativo de la parte aérea (RSDW) en presencia de Cd, PI 199257 y W6 6023, y dos de los cultivares potencialmente tolerantes (W6 6019 y W6 6023) mostraron RSDWs significativamente superiores (95%) al resto de los cultivares (<80%). Finalmente, la relación R/S fue afectada negativamente por la exposición a Cd en todos los cultivares, aunque todos los cultivares potencialmente tolerantes alcanzaron mayores R/S que los cultivares sensibles, especialmente W6 6019 con 74%.

No se observaron diferencias fenotípicas o anatómicas obvias entre los cultivares clasificados como potencialmente tolerantes y los cultivares sensibles, en ningún tratamiento.

Tabla 9. Parámetros morfológicos de diferentes cultivares crecidos en sobres hidropónicos en presencia o ausencia de Hg o Cd.

	Cultivar	RNL	RRG	RRFW	RRDW	RSFW	RSDW	R/S
Mercurio	PI 199257	74,07 ± 0,93* cd	40,31 ± 1,62* d	36,93 ± 4,37* d	75,56 ± 11,80 c	77,28 ± 4,35* d	84,52 ± 7,99 b	40,10 ± 6,77* b
	PI 384634	70,08 ± 3,42* d	51,98 ± 8,73* c	68,11 ± 7,46* c	95,21 ± 2,43 b	80,12 ± 3,00 cd	84,20 ± 0,81 b	54,05 ± 12,65* b
	PI 516950	84,54 ± 2,73 c	76,39 ± 6,53* b	91,04 ± 2,32 b	95,34 ± 1,38 b	94,27 ± 3,55 c	102,92 ± 4,57 ab	51,21 ± 10,07* b
	W6 5992	100,00 ± 0,00 b	68,87 ± 3,34* b	99,30 ± 2,69 a	114,48 ± 1,87* a	103,15 ± 3,92 ab	114,93 ± 2,02* ab	48,37 ± 7,12* b
	W6 6019	200,00 ± 0,00* a	77,60 ± 5,65* b	112,13 ± 3,45 a	106,84 ± 4,53 a	111,11 ± 4,04 ab	116,40 ± 4,54 ab	71,03 ± 5,91* a
	W6 6023	102,50 ± 2,50 b	73,10 ± 1,57* b	76,52 ± 1,75* b	102,06 ± 4,64 a	119,55 ± 4,55* ab	127,82 ± 4,41* a	47,51 ± 6,23* b
	W6 6107	100,00 ± 0,00 b	73,94 ± 2,46* b	94,28 ± 12,15 a	122,29 ± 1,92 a	130,95 ± 6,87* a	130,10 ± 5,06 a	46,99 ± 14,03* b
	W6 6142	80,64 ± 4,03* c	93,61 ± 3,86 a	70,55 ± 3,28* bc	60,33 ± 3,96* c	75,82 ± 2,14* d	81,36 ± 5,94 b	50,85 ± 6,68* b
	Cultivar	RNL	RRG	RRFW	RRDW	RSFW	RSDW	R/S
Cadmio	PI 199257	64,58 ± 6,25* b	35,11 ± 0,80* ab	42,06 ± 3,16* bc	86,83 ± 8,93 a	70,72 ± 7,38* bcd	79,83 ± 6,57* ab	53,24 ± 3,19* bc
	PI 384634	51,92 ± 5,76* b	30,55 ± 1,42* b	33,64 ± 2,83* c	70,33 ± 8,59 a	67,30 ± 4,44* cd	79,83 ± 3,18 ab	49,35 ± 2,52* bc
	PI 516929	93,47 ± 2,66 a	40,85 ± 1,59* a	52,61 ± 3,64* ab	83,38 ± 3,44 a	87,73 ± 4,69 ab	79,62 ± 3,71 ab	62,80 ± 3,42* abc
	PI 516933	85,71 ± 7,65 a	40,34 ± 4,99* a	38,63 ± 5,31* c	74,94 ± 9,25 a	60,26 ± 6,75* d	76,26 ± 8,55 ab	68,06 ± 3,91* ab
	PI 516950	58,18 ± 8,39* b	29,26 ± 1,61* b	43,97 ± 6,21* abc	80,75 ± 14,57 a	72,00 ± 11,27 bcd	76,96 ± 12,04 ab	57,03 ± 5,15* abc
	W6 6019	100,00 ± 0,00 a	41,46 ± 1,78* a	59,04 ± 6,00* a	91,95 ± 3,49 a	100,36 ± 3,1 a	94,89 ± 6,68 a	73,94 ± 6,07* a
	W6 6023	100,00 ± 0,01 a	42,50 ± 0,89* a	46,60 ± 1,93* abc	88,87 ± 0,53 a	77,99 ± 4,76 bc	94,84 ± 6,57 a	60,24 ± 3,80* abc
	W6 6142	67,74 ± 1,97* b	40,90 ± 1,77* a	44,33 ± 3,30* bc	72,70 ± 5,49* a	64,22 ± 5,28* cd	66,75 ± 8,27* b	65,00 ± 3,45* abc

Número relativo de hojas (RNL); crecimiento relativo de la raíz principal (RRG); peso fresco relativo de raíz (RRFW) peso fresco relativo de parte aérea (RSFW); peso seco relativo de raíz (RRDW) peso seco relativo de parte aérea (RSDW); relación peso raíz / peso parte aérea (R/S). En la tabla se indican los errores estándar. * Diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar (ANOVA de una vía, $p < 0.05$, $n = 5-10$). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre cultivares, para cada parámetro (LSD test, $p \leq 0.05$).

1.3.1. Análisis factorial y construcción de índices de tolerancia

Se realizó un análisis factorial (método PCA) utilizando los valores obtenidos para los diferentes parámetros relativos con el objetivo de identificar los principales responsables de la varianza observada.

El PCA reveló que un 73,57% de la varianza total observada en exposición a Hg podía ser explicada por dos componentes. El primer componente (PC1) acumulaba un 48,77% de la varianza, concediendo a los parámetros relativos los pesos o importancias siguientes:

$$PC1 = RNL \times 0,918 + RRG \times (-0,068) + RRFW \times 0,809 + RRDW \times 0,204 + RSFW \times 0,801 + RSDW \times 0,860$$

El segundo componente (PC2) acumulaba un 24,80% de la varianza, concediendo los siguientes pesos a los parámetros relativos:

$$PC2 = RNL \times 0,010 + RRG \times (-0,708) + RRFW \times 0,090 + RRDW \times 0,761 + RSFW \times 0,455 + RSDW \times 0,440$$

De igual forma, un 83,42% de la varianza total observada en exposición a Cd podía ser explicada por dos componentes. El primero (PC1) acumulaba un 49,02% de la varianza, concediendo los siguientes pesos a los diferentes parámetros relativos:

$$PC1 = RNL \times 0,46 + RRG \times 0,076 + RRFW \times 0,568 + RRDW \times 0,887 + RSFW \times 0,875 + RSDW \times 0,921$$

Y el PC2 acumuló un 34,40% de varianza, con los siguientes pesos:

$$PC2 = RNL \times 0,749 + RRG \times 0,959 + RRFW \times 0,66 + RRDW \times 0,165 + RSFW \times 0,347 + RSDW \times 0,031$$

Haciendo uso de las ecuaciones y pesos obtenidos para los diferentes parámetros mediante el análisis factorial, se generó un índice de tolerancia (TI) a Hg y un índice de tolerancia a Cd, conforme a la siguiente ecuación:

$$TI = \left[\frac{\sum(RX \times LVXPC1)}{100} \right] \times \%VarPC1 + \left[\frac{\sum(RX \times LVXPC2)}{100} \right] \times \%VarPC2$$

Los índices fueron normalizados (nTI) para variar entre 0 y 1, dividiendo por el máximo TI obtenido para los cultivares analizados, generando una clasificación de tolerancias para ambos metales (Tabla 10).

Se obtuvo una clasificación de tolerancia a Hg con nTIs de 1 a 0,4, en donde los nTIs para los cultivares potencialmente tolerantes a Hg fueron los más elevados, coincidiendo con la clasificación de tolerancias obtenida mediante el RRG en el *screening* rápido. Esto confirmó que los cultivares potencialmente tolerantes eran en

efecto tolerantes, con un nTI superior a 0,6 y que W6 6019 era el cultivar más tolerante a Hg entre todos los testados. Sin embargo, a pesar de que todos los cultivares sensibles mostraron nTIs inferiores a 0,6, su clasificación de tolerancias no coincidió exactamente con la obtenida mediante RRG del *screening* inicial.

La clasificación de tolerancia a Cd obtenida mediante nTI no se ajustó exactamente a la clasificación obtenida mediante el *screening* inicial, si bien de nuevo se confirmó que W6 6019 era el cultivar más tolerante a Cd. Además los cultivares W6 6023 y PI 516929, se confirmaron como tolerantes ($nTI > 0,78$) a Cd a pesar de no corresponderse exactamente con la clasificación mediante RRG del *screening* inicial. Por el contrario, el cultivar PI 516933 mostró un nTI más próximo a los cultivares sensibles a Cd (0,75). Este cultivar cumplía los requisitos del *screening* rápido para ser aparentemente tolerante a Cd, pero no cumplió los requisitos para ser tolerante en el experimento más largo y considerando un mayor número de parámetros, por lo que fue clasificado como sensible a Cd. Los cultivares sensibles mostraron nTIs inferiores a los cultivares tolerantes ($< 0,78$) y al igual que en la clasificación de tolerancia a Hg, el orden de tolerancias para estos cultivares sensibles no coincidió exactamente con el orden obtenido mediante RRG en el *screening* inicial.

Tabla 10. Índices de tolerancia normalizados (nTIs) y clasificación de cultivares tolerantes y sensibles de *M. truncatula*, expuestos a Hg o Cd en sobres de cultivo hidropónico. Como referencia se indican los crecimientos relativos (RRGs) obtenidos en el *screening* de tolerancias.

Mercurio				Cadmio			
	Cultivar	nTI	RRG		Cultivar	nTI	RRG
Tolerante	W6 6019	1	141,7	Tolerante	PI 516929	0,9	85,9
	W6 6107	0,77	100		W6 6019	1	83,3
	W6 5992	0,72	79,4		W6 6023	0,92	66,2
	W6 6023	0,63	77,9	Sensible	PI 516933	0,75	90
Sensible	PI 516950	0,56	49,5		PI 516950	0,74	44,25
	W6 6142	0,4	22		W6 6142	0,72	28,49
	PI 384634	0,52	19,7		PI 384634	0,68	9,75
	PI 199257	0,52	16,1		PI 199257	0,78	8,93

Representando gráficamente los componentes principales, enfrentados en un diagrama de dispersión junto con los valores que registraba cada cultivar para cada componente, se observaron dos grupos bien diferenciados, que se correspondieron con los cultivares tolerantes y sensibles (Figura 15).

En respuesta al tratamiento con Hg, los grupos estaban asociados fundamentalmente al PC1, y los cultivares tolerantes a Hg exhibían los valores más altos para este componente. El número relativo de hojas y el peso seco relativo de la parte aérea fueron los dos parámetros relativos de mayor influencia (pesos de 0,918 y 0,860 respectivamente) en la varianza observada en el ensayo.

En respuesta a la exposición a Cd, los grupos estaban asociados a los dos componentes y los cultivares tolerantes de nuevo exhibieron los valores más elevados para ambos componentes. Los pesos secos, tanto de la raíz como de la parte aérea (pesos 0,887 y 0,921) en la primera componente y el RRG (0,959) en la segunda componente, fueron los parámetros relativos de mayor influencia en la varianza observada en el ensayo.

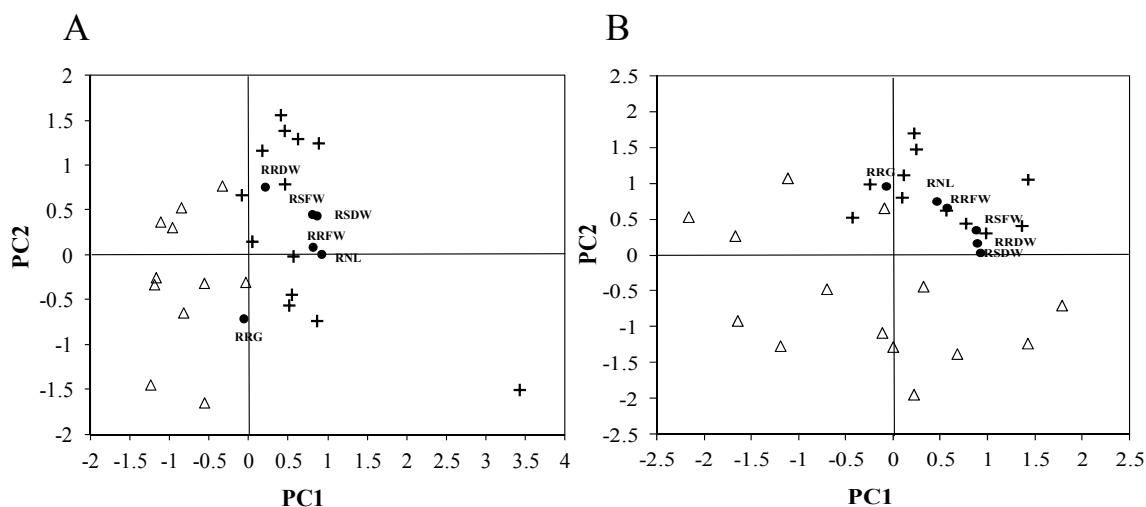


Figura 15. Gráfico de dispersión representando los componentes principales obtenidos en el análisis factorial para cultivares expuestos a Hg ($n = 25$) (A) y para cultivares expuestos a Cd ($n = 24$) (B). Se representan los cultivares tolerantes (+), los cultivares sensibles (Δ) y los parámetros relativos a los pesos o importancias obtenidas en el análisis (•).

En cualquier caso, a pesar de que la clasificación de tolerancias no fue idéntica a la obtenida mediante el *screening* rápido inicial, los resultados validaron el *screening* y demostraron que, en general, valores elevados de RRG, en estadio de plántula fueron buenos predictores de un buen desarrollo y producción de biomasa aérea de las plantas

en presencia de metal (Hg o Cd); pero de todos modos los ensayos de validación son necesarios para evitar la interpretación de falsos tolerantes.

1.3.2. Tolerante vs. sensible

Con el objetivo de comparar entre cultivares tolerantes y cultivares sensibles, los datos procedentes de los experimentos de verificación fueron combinados considerando cada cultivar como réplica de su categoría de tolerancia, conforme a la clasificación obtenida mediante nTI (Figura 16). Este enfoque permitió la identificación de patrones diferenciales de respuesta a Hg o Cd entre las categorías tolerante y sensible, además de permitir la selección de los parámetros indicadores de tolerancia (o toxicidad) más adecuados para estas condiciones experimentales.

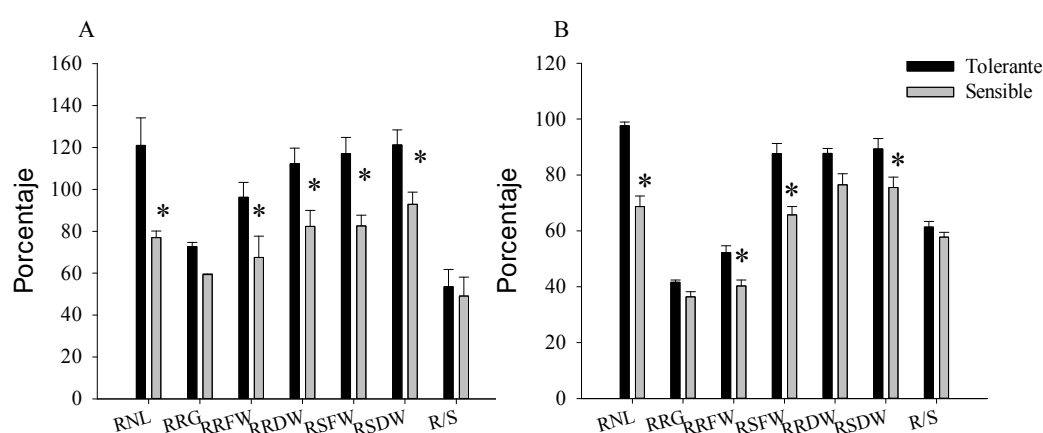


Figura 16. Promedios de los parámetros relativos para los cultivares tolerantes y sensibles expuestos a Hg (A) y a Cd (B) en sobres de cultivo hidropónico. Número relativo de hojas (RNL); crecimiento relativo de la raíz principal (RRG); pesos frescos relativos de raíz (RRFW) y de parte aérea (RSFW); pesos secos relativos de raíz (RRDW) y de parte aérea (RSDW); relación peso raíz / peso parte aérea (R/S). Las barras indican el error estándar. * Diferencias significativas entre cultivares (ANOVA multivariante, $p < 0,05$, $n \geq 10$).

Para los cultivares expuestos a Hg, todos los parámetros relativos fueron inferiores al 90% en la categoría sensible. Sin embargo, RNL, RRDW, RSFW y RSDW superaron el 110% en la categoría tolerante, indicando un mejor crecimiento de las plantas en presencia de Hg. De hecho, todos los parámetros relativos en la categoría tolerante fueron significativamente superiores (30%-40%) a los observados en la categoría sensible, exceptuando el RRG, que aunque mostro un valor superior para la categoría tolerante la diferencia no fue significativa. Los valores promedio de la relación R/S fueron similares en cultivares sensibles y tolerantes expuestos a Hg.

En el tratamiento con Cd, todos los parámetros relativos mostraron valores $<100\%$ en ambas categorías, aunque el RNL para la categoría tolerante mostró un valor del 98%. En la categoría tolerante, los parámetros RNL, RRFW, RSFW y RSDW

mostraron valores significativamente superiores a los observados para la categoría sensible. El resto de parámetros (RRG; RRDW y R/S) mostraron valores similares en cultivares sensibles y tolerantes expuestos a Cd.

1.4. Contenido de Hg, Cd y porcentajes de traslocación

Se determinaron los contenidos de metales en las raíces y la parte aérea de las plantas tratadas con Hg o Cd durante 12 días en sobres de cultivo hidropónico y se calcularon los porcentajes de traslocación (%TF) (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración de metales en raíz y parte aérea y factor de traslocación (%TF) de cultivares tolerantes y sensibles a Hg y/o Cd de *M. truncatula* crecidas en sobres de cultivo hidropónico en presencia o ausencia de Hg o Cd, durante 12 días. Se indica la desviación estándar.

		[Hg] mg/kg		%TF
	Cultivar	Raíz	Parte aérea	
Tolerante	W6 6019	155 ± 6,5 d	7 ± 0,93 d	4,84
	W6 6107	1355 ± 33,3 b	29 ± 2,17 cd	2,14
	W6 5992	455 ± 11,1 cd	19 ± 2,97 cd	4,30
	W6 6023	1046 ± 8,1 b	37 ± 4,68 c	3,55
Sensible	PI 516950	1536 ± 6,1 a	128 ± 15,19 a	8,35
	W6 6142	1784 ± 30,3 a	124 ± 10,48 a	6,96
	PI 384634	987 ± 25,9 b	144 ± 22,2 a	14,68
	PI 199257	591 ± 7,9 c	94 ± 11,91 b	16,01
		[Cd] mg/kg		%TF
	Cultivar	Raíz	Parte aérea	
Tolerante	W6 6019	672 ± 12,8 g	29 ± 0,7 c	4,31
	W6 6023	963 ± 15,5 d	16 ± 0,3 f	1,66
	PI 516929	1802 ± 129,9 a	32 ± 0,3 a	1,78
Sensible	PI 199257	1080 ± 19,3 c	16 ± 0,5 f	1,48
	PI 516933	902 ± 9,2 de	16 ± 0,4 f	1,77
	PI 516950	748 ± 9,9 fg	31 ± 0,4 b	4,14
	W6 6142	1403 ± 24,7 b	27 ± 0,1 d	1,92
	PI 384634	831 ± 10,7 ef	20 ± 0,5 e	2,41

Diferentes letras indican diferencias significativas entre cultivares para cada tejido (Test Tukey HSD, $p \leq 0,05$, $n = 4$).

Tanto para Hg como para Cd, la concentración en las raíces fue siempre superior a la concentración en la parte aérea, para todos los cultivares. Los cultivares tolerantes a Hg acumularon menor cantidad de Hg en la parte aérea que los cultivares sensibles. Entre los cultivares tolerantes a Hg, W6 6107 y W6 6023 fueron los que acumularon mayores

niveles de Hg en ambos órganos. Los cultivares sensibles mostraron mayor traslocación de Hg a la parte aérea (7%-16%) que los cultivares tolerantes. Entre los cultivares tolerantes a Hg, W6 6019 y W6 5992 alcanzaron los mayores factores de traslocación de Hg (4,84% y 4,30%), a pesar de no mostrar elevadas concentraciones de Hg en las raíces.

Las concentraciones de Cd observadas en las raíces y las partes aéreas fueron bastante diversas. PI 516929 mostró la concentración más elevada de Cd en ambos órganos. El resto de cultivares tolerantes a Cd (W6 6019 y W6 6023) mostraron contenidos de Cd más moderados, al menos en raíces. De nuevo el cultivar que mostró mayor traslocación de Cd fue W6 6019 (4,31%), a pesar de ser el cultivar con menor concentración de Cd en sus raíces.

1.5. Efecto del Cd sobre el estado nutricional

Se determinaron los contenidos de nutrientes (K, Ca, Na, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn, Cu) en las raíces y partes aéreas de las plantas sometidas a 0 ó 100 μM CdCl_2 , durante 12 días en sobres de cultivo hidropónico.

El efecto del Cd sobre el contenido de macro y micronutrientes en las raíces y la parte aérea de los diferentes cultivares testados fue muy diverso (Tablas suplementarias 2 y 3), aunque se observaron algunas características comunes. En todos los cultivares estudiados, el Cd produjo disminuciones significativas en los contenidos de P en la raíz y la parte aérea, con excepción de las raíces de W6 6023, de Ca y S en la parte aérea y de Mn en la raíz. Además, en la raíz de los cultivares tolerantes tratados con Cd los contenidos de S y de Fe aumentaron significativamente, respecto a los controles. No se pudo llegar a ninguna conclusión con el resto de los nutrientes, porque el efecto del Cd fue heterogéneo y no parecía depender de si el cultivar pertenecía a la categoría tolerante o a la sensible.

Aunque el número de cultivares pertenecientes a cada categoría era bajo, los datos fueron combinados y analizados estadísticamente (ANOVA de una vía, $p \leq 0,05$, $n=3-5$) considerando cada cultivar como réplica de su categoría de tolerancia, conforme a los nTIs (Tabla 12), con el objetivo de detectar una respuesta diferencial entre categorías de tolerancia, pero siendo conscientes de que las diferencias a título individual de cada cultivar podrían quedar diluidas por el análisis.

El Cd afectó significativamente a más elementos en los cultivares de la categoría sensible, donde los contenidos de Mg y Fe de raíces aumentaron significativamente y los contenidos de P y Mn disminuyeron significativamente, y todos los macro y

micronutrientes disminuyeron significativamente en la parte aérea de la categoría sensible, a excepción del Fe que mantuvo los mismos niveles que en ausencia de Cd.

Tabla 12. Contenido de nutrientes de los cultivares tolerantes y sensibles a Cd, crecidos en sobres de cultivo hidropónico en 0 ó 100 μM CdCl_2 del metal durante 12 días.

Nutriente	Tratamiento	Raíz		Parte aérea	
	CdCl ₂ (μM)	Tolerante	Sensible	Tolerante	Sensible
Macronutrientes (μg/g)					
K	0	49382 aA	51929 aA	68883 aA	73441 aA
	100	46120 aB	50293 aA	58683 bA	58143 bA
Ca	0	3306 aA	3169 aA	3808 aB	4716 aA
	100	3710 aA	3443 aA	1601 bA	1845 bA
Na	0	1548 aA	1498 aA	550 aA	591 aA
	100	1401 aA	1289 aA	508 bA	502 bA
Mg	0	1214 aA	1118 bA	1584 aB	1799 aA
	100	1259 aA	1273 aA	1190 bB	1468 bA
P	0	3478 aB	5102 aA	4714 aA	5214 aA
	100	3065 aB	3789 bA	2802 bB	3843 bA
S	0	1316 bB	1926 aA	1774 aA	2008 aA
	100	1933 aA	1735 aA	1140 bA	1155 bA
Micronutrientes (μg/g)					
Fe	0	134 aA	125 bA	66 aA	65 aA
	100	191 aA	238 aA	63 aA	64 aA
Mn	0	192 aA	211 aA	45 aA	49 aA
	100	73 bA	67 bA	42 aA	44 bA
Zn	0	133 aA	120 aA	37 aA	39 aA
	100	73 aB	148 aA	48 aA	34 bB
Cu	0	117 aA	94 aA	27 aA	27 aA
	100	100 aA	140 aA	40 aA	21 bB

Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada órgano; Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre cultivares tolerantes y sensibles para cada órgano (ANOVA de una vía, $p \leq 0,05$, $n=3-5$).

Los cultivares de la categoría tolerante en promedio manifestaron un mejor mantenimiento del contenido nutricional y tan solo el S y Mn fueron afectados significativamente por la exposición a Cd, incrementándose el contenido de S y

reduciéndose el contenido de Mn en las raíces tratadas. Además, en la parte aérea de la categoría tolerante sólo los macronutrientes se vieron afectados, disminuyendo significativamente su contenido a consecuencia del tratamiento.

Comparando entre categorías de tolerancia (tolerante vs. sensible) encontramos patrones diferenciales en el contenido nutricional ya en ausencia de Cd. Las raíces no tratadas de los cultivares tolerantes a Cd mostraron contenidos de P y S significativamente menores a los observados en las raíces de los cultivares sensibles. De igual manera, la parte aérea de los cultivares tolerantes sin tratar mostró contenidos de Ca y Mg significativamente menores a los observados en la parte aérea de los cultivares sensibles no tratados.

En presencia de Cd, las raíces de los cultivares tolerantes mostraron contenidos de K, P y Zn significativamente inferiores a las raíces de los cultivares sensibles, mientras que en la parte aérea de los cultivares tolerantes se observaron contenidos de Mg y P significativamente menores y contenidos de Zn y Cu significativamente mayores que los valores observados en la parte aérea de los cultivares sensibles.

2. Caracterización de la respuesta a Cd para dos cultivares de *M. truncatula*, uno sensible y otro tolerante

Con el objetivo de estudiar los mecanismos de tolerancia y toxicidad a Cd en diferentes estadios de desarrollo, se seleccionaron dos cultivares de *M. truncatula*, uno tolerante a Cd (PI 516929; *CdT*) y otro sensible a Cd (W6 6142; *CdS*), morfológicamente similares en ausencia de Cd.

2.1. Efecto del Cd sobre la germinación y la movilización de reservas en cotiledones

Para estudiar el efecto del Cd sobre la germinación y la movilización de reservas almacenadas, se germinaron semillas de los cultivares *CdT* y *CdS* en presencia y ausencia de CdCl₂ (200 µM), durante 3 días, calculándose el porcentaje de germinación al final del experimento y recolectándose los cotiledones para determinar la actividad α -amilasa, como indicador de la movilización de reservas durante la germinación.

El Cd produjo una reducción significativa en la germinación de *CdS* (23%) con respecto a las condiciones control (ausencia de Cd). Sin embargo, el Cd no afectó significativamente la germinación de *CdT* (Figura 17). También se observó que la actividad α -amilasa, ya en ausencia de Cd, era significativamente mayor en *CdS*, hidrolizando mayor cantidad de almidón (194 µg gPF⁻¹ min⁻¹) que *CdT* (147 µg gPF⁻¹ min⁻¹). La exposición a Cd provocó una reducción significativa de la actividad α -amilasa en ambos cultivares (69 µg gPF⁻¹ min⁻¹ para *CdS* and 109 µg gPF⁻¹ min⁻¹ para

CdT), sin embargo fue mucho más marcada en *CdS* (64% de reducción) que en *CdT* (26% de reducción).

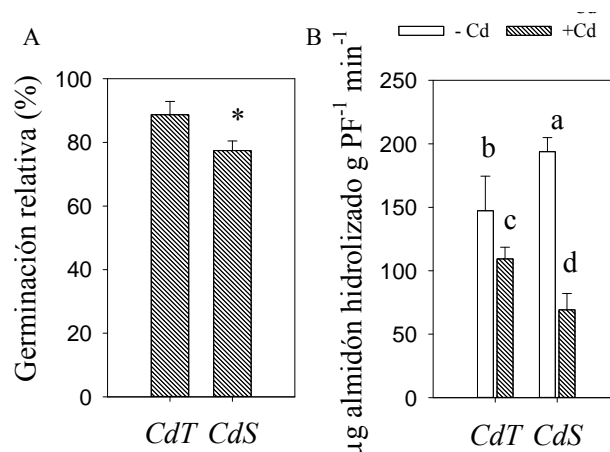


Figura 17. Germinación en presencia de Cd (200 μM de CdCl₂ durante 3 días) relativa al control sin Cd (A) y actividad α -amilasa en los cotiledones (B) de los cultivares tolerante *CdT* y sensible *CdS* en 0 ó 200 μM de CdCl₂. Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con el control (Test Chi-cuadrado (χ^2), significación asintótica, n=3). Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test Tukey HSD, $p \leq 0,05$, n = 4).

2.2. Expresión de genes de los principales componentes de la maquinaria antioxidante en plántulas en respuesta a Cd

Se determinaron los patrones de expresión, mediante qRT-PCR, de algunos de los principales componentes de la maquinaria antioxidante, en raíces de *CdT* y *CdS* expuestas a 0 ó 50 μM CdCl₂, durante 12 h en sistema hidropónico miniaturizado.

El primer grupo de genes analizados fueron los de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasas (SODs), responsables de la dismutación de O₂⁻ a O₂ y H₂O₂ (en diferentes localizaciones subcelulares), y catalasa (CAT), responsable de catalizar directamente la descomposición de H₂O₂ a O₂ y H₂O en los peroxisomas. Se determinaron los patrones de expresión de un gen de CAT y de cinco genes correspondientes a tres tipos de SODs: un gen de FeSOD, un gen de MnSOD y tres genes homólogos de CuZnSOD. El segundo grupo de genes analizado se correspondió con genes relacionados con la biosíntesis de glutatión y fitoquelatinas, determinándose los patrones de expresión de los genes de cisteína sintasa (CYS), γ -glutamylcisteína sintetasa (γ ECS), glutatión sintetasa (GSHS), homoglutatión sintetasa (hGSHS), fitoquelatina sintasa (PCS) y glutatión peroxidasa (GPX). Por último, el tercer grupo de genes analizado fue el de genes relacionados con el ciclo ASC-GSH y genes relacionados con la generación de NADPH, determinándose los patrones de expresión de los genes de glutatión reductasa (GR), monodehidroascorbato reductasa (MR),

galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH, que cataliza el último paso de la biosíntesis de ascorbato) en relación al ciclo ASC-GSH y los genes de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en relación a la generación de NADPH.

En ausencia de Cd, muchos de los genes analizados mostraron niveles mayores de expresión en el cultivar *CdS* que en el cultivar *CdT* (Figura 18), evidenciándose diferencias basales en la expresión de estos genes que podrían explicar las diferencias en la tolerancia a Cd.

Los niveles de mRNA fueron significativamente mayores en el cultivar *CdS* para los genes de *MtCuZnSOD* *a*, *b* y *c* (3, 3,5 y 4,3 veces, respectivamente), *MtMnSOD* (3 veces), *MtgECS*, *MtPCS*, *MtGPX* (2,3, 2,6 y 2,3 veces, respectivamente) y *MtMR*, *MtGalLDH*, *MtICDH* (3, 4 y 2,3 veces, respectivamente). El transcrito *MtG6PDH* fue el único que se acumuló en mayor cantidad (2 veces) en el *CdT* que en el *CdS* en ausencia de Cd. Los dos cultivares mostraron niveles de expresión semejantes de los genes *MtFeSOD*, *MtCAT*, *MtCYS*, *MtGSHS*, *MthGSHS*, *MtGR* y *MtG6PDH*.

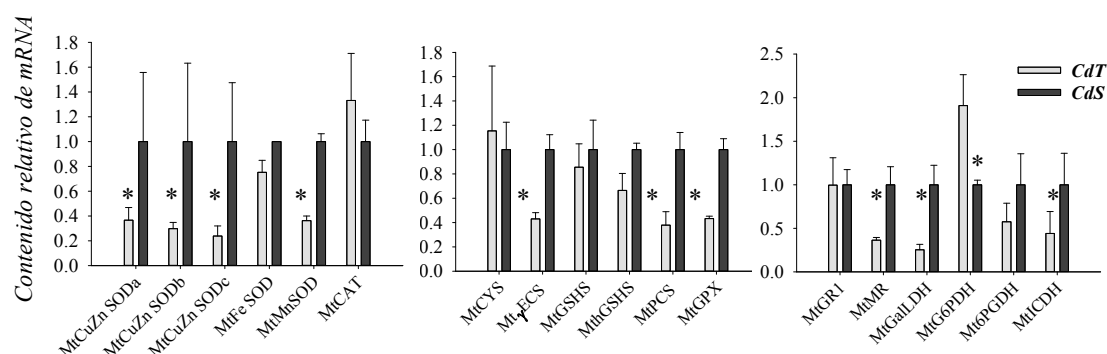


Figura 18. Análisis de los patrones de expresión de los principales componentes de la maquinaria antioxidante y biogénesis de NADPH en raíces de dos cultivares de *M. truncatula*, uno tolerante a Cd (*CdT*) y otro sensible (*CdS*), en 0 μ M CdCl_2 , durante 12 h. Las barras indican la desviación estándar ($n=4$). *Factores de cambio > 2 . Superóxido dismutasa (SOD); Catalasa (CAT); Cisteína sintasa (CYS); γ - glutamylcisteína sintetasa (γ ECS); Glutación sintetasa (GSHS); Homoglutación sintetasa (hGSHS); Fitoquelatina sintetasa (PCS); Glutación peroxidasa (GPX); Glutación reductasa (GR); Monodehidroascorbato reductasa (MR); Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH); Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH); Isocitrato deshidrogenasa (ICDH).

El tratamiento con Cd aumentó significativamente la expresión de los genes *MtCAT* (4,5 veces), *MtgECS* (3,3 veces), *MtMR*, *MtG6PDH*, *Mt6PGDH* y *MtICDH* (2, 11, 3 y 2,7 veces, respectivamente) en el cultivar *CdT*. Los niveles de transcritos para el resto de genes no variaron significativamente (Figura 19A). En el cultivar *CdS*, el tratamiento

con Cd produjo un aumento significativo en la acumulación de mRNA para *MtCYS*, *MtGSHS*, *MtGR* y *MtG6PDH* (3, 5 y 11 veces, respectivamente) y *MtCuZnSODa* y *MtCuZnSODc* (3 y 4,5 veces, respectivamente) y *MtGalLDH* (4,5 veces) (Figura 19B).

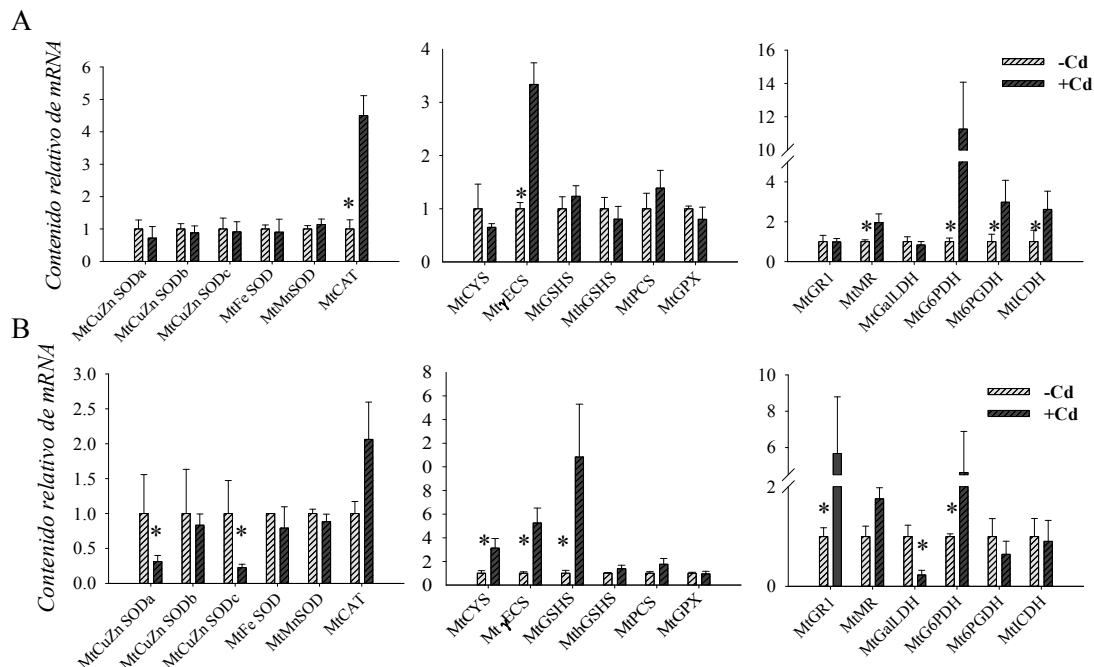


Figura 19. Análisis de los patrones de expresión de los principales componentes de la maquinaria antioxidante y biogénesis de NADPH en raíces de dos cultivares de *M. truncatula*, uno tolerante a Cd (*CdT*) (A) y otro sensible (*CdS*) (B), expuestos a 0 ó 50 μM CdCl_2 durante 12 h. Las barras indican la desviación estándar ($n=4$). *Factores de cambio > 2. *Superóxido dismutasa (SOD)*; *Catalasa (CAT)*; *Cisteína sintasa (CYS)*; γ - *glutamylcisteína sintetasa (γECS)*; *Glutación sintetasa (GSHS)*; *Homoglutación sintetasa (hGSHS)*; *Fitoquelatina sintetasa (PCS)*; *Glutación peroxidasa (GPX)*; *Glutación reductasa (GR)*; *Monodehidroascorbato reductasa (MR)*; *Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH)*; *Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)*; *6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH)*; *Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)*.

2.3. Contenido de glutatión y daño oxidativo en raíces de plántulas expuestas a Cd

Para profundizar en el estudio de los antioxidantes no enzimáticos y el daño oxidativo producido por la exposición a Cd, se determinaron los contenidos de glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH), así como la peroxidación de lípidos y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática en raíces de *CdT* y *CdS* expuestas a 0 ó 50 μM CdCl_2 , durante 12 h en sistema hidropónico miniaturizado.

El contenido de GSSG y GSH se redujo significativamente en respuesta a Cd para ambos cultivares. Por otro lado, la relación GSH/GSSG no varió significativamente en

el cultivar *CdS* en presencia de Cd; por el contrario, dicha relación se incrementó significativamente en el cultivar *CdT* en respuesta al tratamiento (Figura 20).

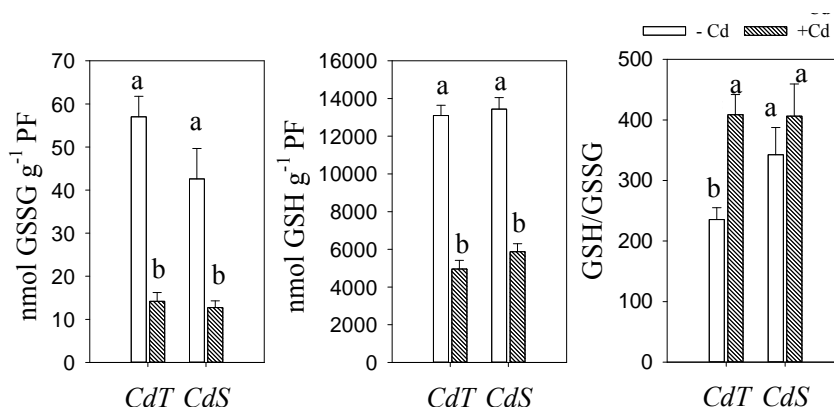


Figura 20. Contenido de glutatión oxidado (GSSG), glutatión reducido (GSH) y relación GSH/GSSG en dos cultivares de *M. truncatula*, uno tolerante a Cd (*CdT*) y otro sensible (*CdS*), expuestos a 0 ó 50 μM CdCl₂ durante 12 h. Las barras indican la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test Tukey HSD, p ≤ 0,05, n = 4).

La peroxidación de lípidos y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática fueron determinadas histoquímicamente mediante la tinción con reactivo de Schiff's, que tiñe los aldehídos subproducto de la peroxidación lipídica, y la tinción con Azul de Evans, que tiñe aquellas membranas que han perdido su integridad (Figura 21).

El Cd causó peroxidación de lípidos en ambos cultivares, pero su intensidad y localización varió en función del cultivar (Figura 21A), observándose peroxidación de lípidos a lo largo de toda la raíz de *CdS* expuesta a Cd, con mayor intensidad en el ápice (5 mm aproximadamente), mientras que la peroxidación de lípidos que se observa en el cultivar *CdT* estaba localizada tan solo en los primeros milímetros del ápice de la raíz, indicando que el metal produjo menor daño oxidativo en el cultivar tolerante *CdT*. El Cd produjo pérdida de la integridad de la membrana plasmática en ambos cultivares (Figura 21B), observándose una pérdida de la integridad de la membrana plasmática en *CdS* tratada muy intensa y a lo largo de toda la raíz. Por el contrario, el cultivar *CdT* tratado mostró una pérdida de la integridad de la membrana plasmática menos intensa y a lo largo de la raíz, aunque no en el ápice (4 mm aproximadamente), de nuevo demostrando un menor daño oxidativo en *CdT* producido por el metal.

Mediante un software de procesamiento de imagen (Image J) se cuantificó de manera relativa la densidad de color para ambas tinciones en el primer centímetro de raíz (desde el ápice) (Figura 21C y D), observándose que ya en ausencia de Cd, tanto la peroxidación de lípidos como la pérdida de la integridad de la membrana plasmática

eran el doble de intensas en *CdS* y que la exposición al metal provoca más del doble de daño oxidativo en *CdS* que en *CdT*.

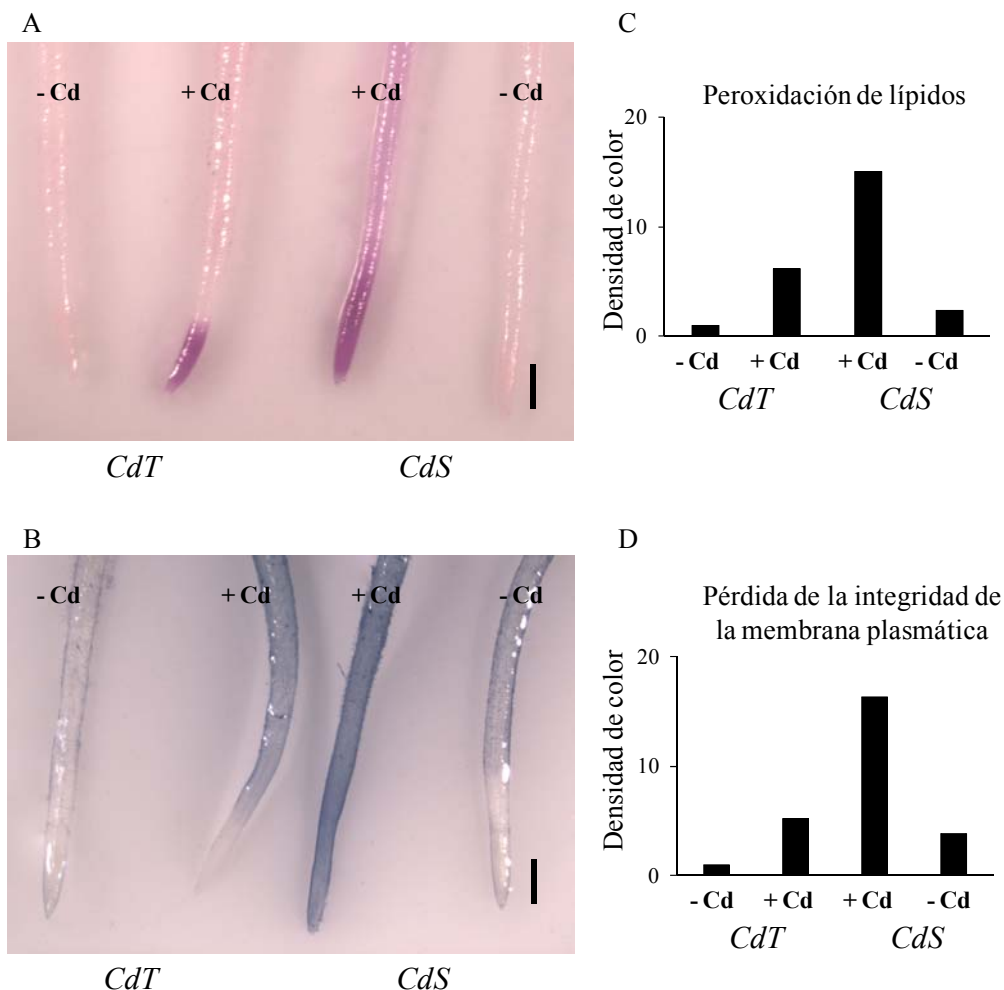


Figura 21. Detección histoquímica del daño oxidativo en dos cultivares de *M. truncatula*, uno tolerante a Cd (*CdT*) y otro sensible (*CdS*), expuestos a 0 ó 50 μM CdCl_2 durante 12 h. Tinción con reactivo de Schiff's para detectar aldehídos procedentes de la peroxidación de lípidos (A), tinción con Azul de Evans para detectar pérdida de la integridad de la membrana plasmática (B). Barra: 2 mm. Cuantificación de densidad de color en el ápice de las raíces (1cm) (C y D).

2.4. Capacidad antioxidante y daño oxidativo los cultivares *CdT* y *CdS* crecidos en contenedores forestales en presencia de Cd

Para evaluar la capacidad antioxidante y el daño oxidativo en respuesta a Cd, en un estadio de desarrollo más avanzado, se utilizaron la raíz y la parte aérea de plantas de *CdT* y *CdS* crecidas en presencia de 0 ó 100 μM CdCl_2 durante 15 días, en contenedores forestales con vermiculita como soporte estéril, confirmándose las diferencias observadas en el crecimiento de los mismos cultivares cuando fueron evaluados en sobres hidropónicos en presencia de Cd (Figura 22).

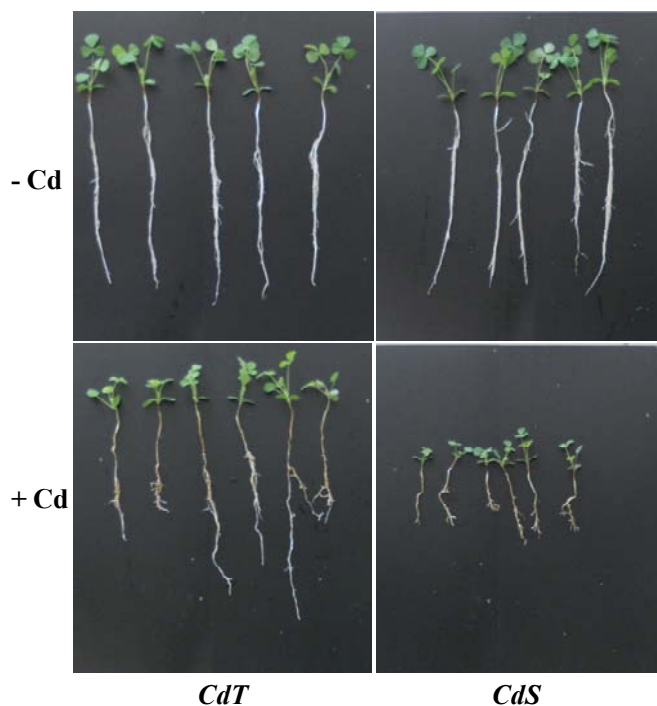


Figura 22. Cultivares de *M. truncatula*, uno tolerante a Cd (*CdT*) y otro sensible (*CdS*), expuestos a 0 ó 100 μM CdCl_2 durante 15 días en contenedores forestales.

Se determinó el contenido de malondialdehído (MDA), que es un subproducto de la peroxidación de lípidos, como indicador del daño oxidativo y las actividades enzimáticas SOD y CAT como indicadores de la capacidad antioxidante de las plantas.

En las raíces (Figura 23A), ambos cultivares mostraron un aumento significativo de la peroxidación de lípidos en presencia de Cd. La actividad total SOD para las raíces fue similar para los dos cultivares en ausencia de Cd, sin embargo la exposición al metal provocó un importante aumento de la actividad SOD en *CdS* (8 veces), mientras que no varió significativamente en *CdT*. La actividad CAT fue significativamente menor (3 veces) en *CdS* que en *CdT* en ausencia de Cd, y el tratamiento provocó un aumento significativo (8,5 veces) de la actividad de esta enzima en *CdS*, mientras que en *CdT* no varió de manera significativa.

En la parte aérea (Figura 23B), la exposición a Cd produjo un incremento significativo de los niveles de MDA en *CdS*, mientras que dichos niveles no variaron significativamente en *CdT*. La actividad SOD en ausencia de Cd fue significativamente menor en la parte aérea de *CdS* que en la de *CdT* y la exposición a Cd provocó un incremento significativo de esta actividad en *CdS*, mientras que se mantuvo sin variaciones significativas en *CdT*. Finalmente, la actividad CAT en la parte aérea de ambos cultivares en ausencia de Cd fue similar, pero el Cd afectó de manera diferente a

la actividad CAT en cada cultivar, causando un aumento significativo en *CdT* y una disminución significativa en *CdS*.

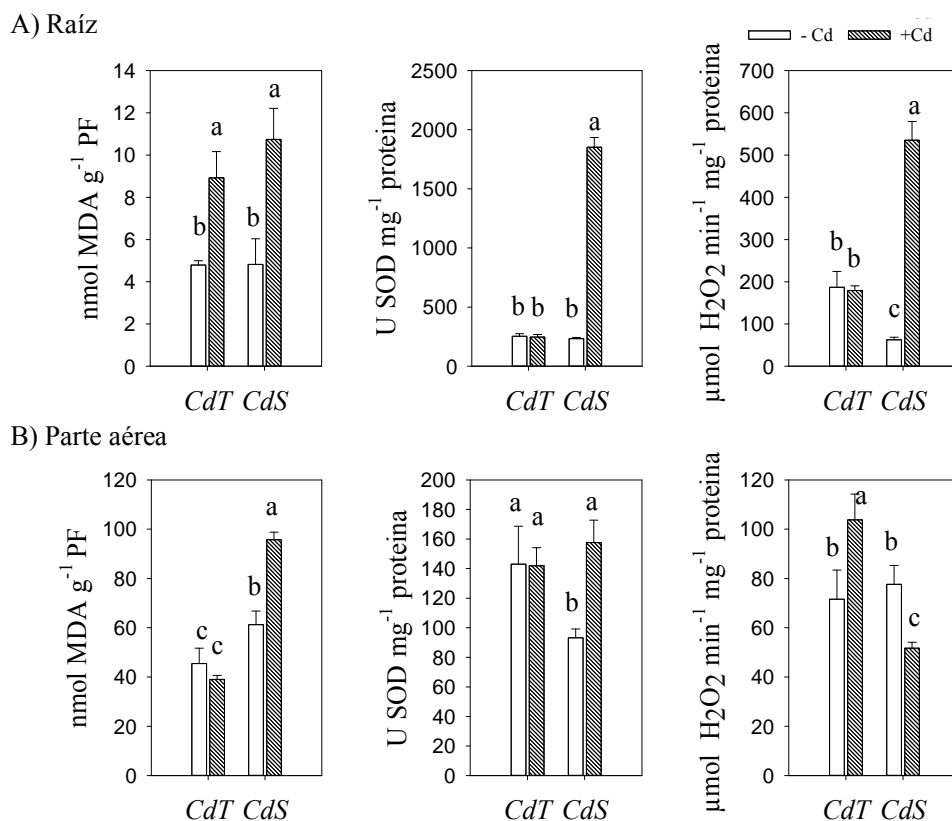


Figura 23. Peroxidación de lípidos (expresada como contenido de MDA), actividad SOD y actividad CAT en las raíces (A) y la parte aérea (B) de dos cultivares de *M. truncatula*, uno tolerante a Cd (*CdT*) y otro sensible (*CdS*), expuestos a 0 ó 100 μM CdCl₂ durante 15 días. Las barras indican el error estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test Tukey HSD, $p \leq 0,05$, $n = 4$).

3. Respuesta a Cd de la línea transgénica de *M. truncatula* p18

Con el objetivo de estudiar el papel de la prolina en los mecanismos de tolerancia y toxicidad a Cd se utilizó la línea transgénica de *M. truncatula* p18, que sobreexpresa el gen Δ^1 -pyrrolina-5-carboxylato sintetasa (*P5CS*) de *Vigna aconitifolia* y acumula prolina (Verdoy *et al.*, 2006). Como control *wild-type* (WT) se utilizó su fondo genético *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3).

3.1. Efecto del Cd sobre la germinación

Para estudiar el efecto del Cd sobre la germinación de la línea transgénica p18 y el WT, se germinaron semillas de ambas líneas en presencia de diferentes concentraciones de Cd (0 – 1,5mM CdCl₂), durante 7 días, calculándose el porcentaje de germinación relativo al control (ausencia de Cd) al final del experimento.

La línea transgénica p18 mostró porcentajes de germinación elevados en todas las concentraciones testadas, sin mostrar diferencias significativas con la germinación en ausencia de Cd (Figura 24), mientras que el Cd afectó significativamente la germinación del WT en todos los tratamientos, mostrando un 50% de germinación en exposición a 0,5 mM de CdCl₂, y tan solo un 36% a partir de 1 mM de CdCl₂.

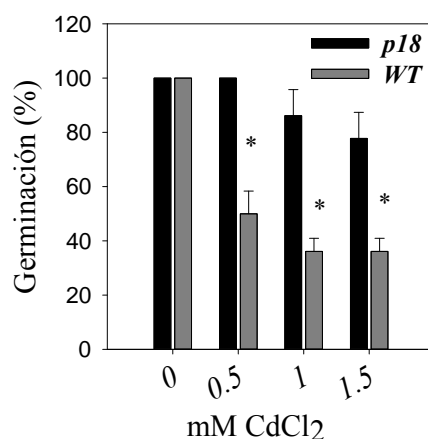


Figura 24. Porcentajes de germinación de semillas de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), expuestas a diferentes concentraciones de Cd (0-1,5 mM CdCl₂) en placa, durante 7 días. Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con el control (ausencia de Cd) (Test Chi-cuadrado (χ^2), significación asintótica, n=3).

3.2. Evaluación de la tolerancia a Cd en sistema hidropónico miniaturizado

Se evaluó la tolerancia a Cd en plántulas de p18 y WT mediante su exposición a 0 ó 10 μ M CdCl₂ durante 48 h, en sistema hidropónico miniaturizado y utilizando el RRG como indicador de la tolerancia (Figura 25). El Cd afectó de manera significativa el RRG en ambas líneas; sin embargo, la línea p18 alcanzó un RRG de 84% en presencia de Cd y por el contrario el WT tan solo mostró un RRG de 51,3%.

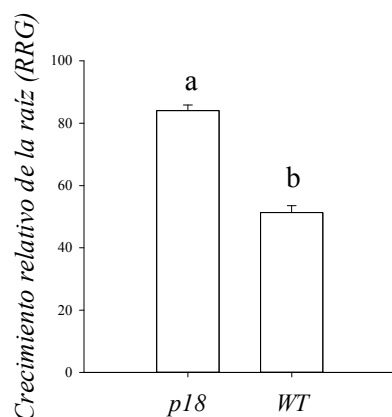


Figura 25. Crecimiento relativo de la raíz (RRG) en presencia de Cd (CdCl₂ 10 μ M), durante 48h, de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT). Las barras indican la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test Tukey HSD, $p \leq 0,05$, n = 10).

3.3. Expresión de genes relacionados con el metabolismo de prolina y los principales componentes de la maquinaria antioxidante en plántulas en respuesta a Cd

Los patrones de expresión génica se determinaron mediante qRT-PCR en raíces de p18 y WT, expuestas a 0 ó 50 μM CdCl_2 , durante 12 h en sistema hidropónico miniaturizado.

La prolina es un metabolito osmoprotector que se acumula en plantas y otros organismos cuando están sometidos a diversos estreses, como los metales pesados (Delauney and Verma, 1993; Sharma *et al.*, 1998). Los patrones de expresión de genes relacionados con su biosíntesis y reciclado, junto con los patrones de expresión del transgen (*V. aconitifolia*, pirrolina-5-carboxilato sintetasa; *VaP5CS*) fueron analizados en respuesta a Cd, incluyendo: Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa 1 (P5CS1), Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa 2 (P5CS2), pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR), prolina deshidrogenasa (ProDH), Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P5CDH), ornithina δ -aminotransferasa (OAT) y un transportador de prolina (ProT).

También fueron analizados los genes de los principales componentes de la maquinaria antioxidante, previamente descritos en la sección 2.1. de Resultados.

La acumulación relativa del transgen *VaP5CS* en la línea transgénica p18 fue similar para la raíz y la parte aérea en ausencia de Cd. Sin embargo, la exposición al metal aumentó 5 veces la acumulación del transcrito en las raíces y la disminuyó 3 veces en la parte aérea. Como era de esperar, no se detectó el transgen en ningún tejido del WT (Figura 26).

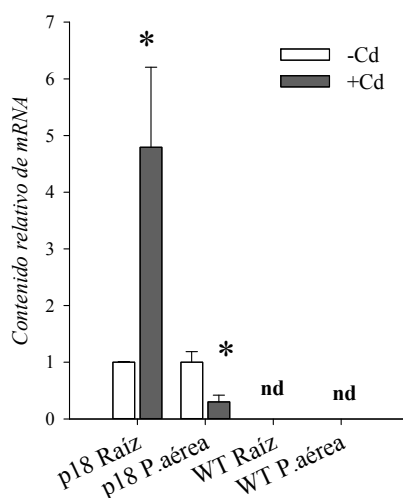


Figura 26. Contenido relativo del transcrito *P5CS* de *Vigna aconitifolia* (*VaP5CS*) en plántulas de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), sometidas a 0 ó 50 μM CdCl_2 durante 12h. Las barras indican la desviación estándar (n=4). *Factor de cambio >2; nd, no detectado.

Respecto a los genes relacionados con el metabolismo de prolina, se observaron claras diferencias entre la línea transgénica p18 y el WT, tanto en ausencia como en presencia de metal. En ausencia de Cd (Figura 27), la mayoría de estos genes mostraron diferencias en los niveles de mRNA entre ambas líneas. En las raíces de p18 se observó para los transcritos de *MtP5CS1*, *MtP5CS2*, *MtP5CR*, *MtP5CDH* y *ProT* una acumulación de 3, 3, 3,2, 3,4 y 3,3 veces más mRNA, respectivamente, que en el WT en ausencia de Cd. *MtOAT* fue el único transcrito que mostró en raíces de p18 niveles de mRNA 2 veces menores que en raíces del WT. En la parte aérea de p18 se observó para los transcritos de *MtP5CS1*, *MtP5CS2*, *MtP5CR*, *MtP5CDH* y *ProT* una acumulación de 2,7, 2, 2,4, 2,4 y 2,4 veces menos mRNA, respectivamente, que en el WT, en ausencia de Cd.

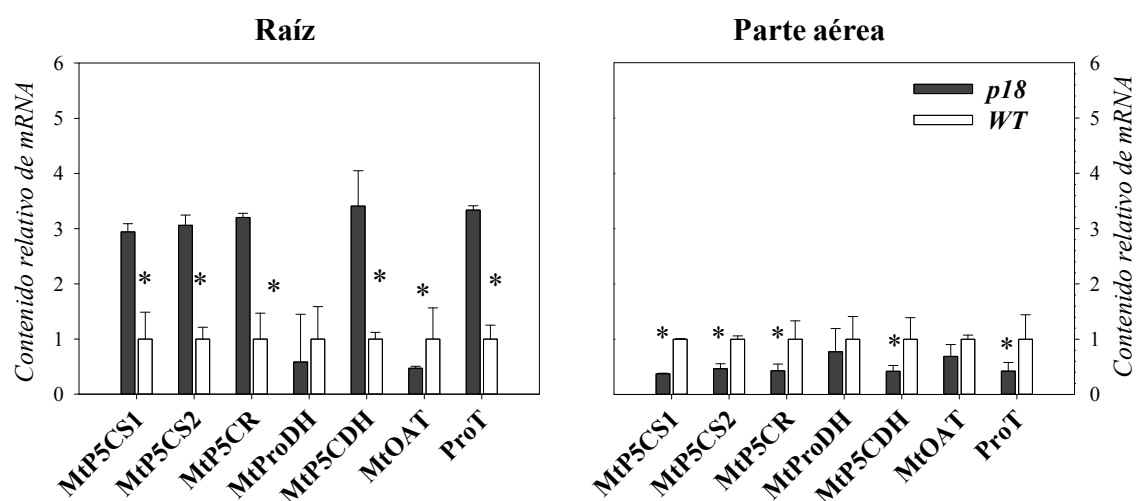


Figura 27. Análisis de los patrones de expresión de componentes del metabolismo de la prolina en plántulas de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), en 0 μ M de CdCl₂ durante 12 h. Las barras indican la desviación estándar (n=4). *Factores de cambio > 2. Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa 1 (*P5CS1*); Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa 2 (*P5CS2*); Pirrolina-5-carboxilato reductasa (*P5CR*); Prolina deshidrogenasa (*ProDH*); Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (*P5CDH*); Ornitina δ -aminotransferasa (*OAT*); Transportador de prolina (*ProT*).

En p18 (Figura 28A), en las raíces tratadas con Cd se produjo un aumento significativo de los transcritos de *MtProDH* y *MtP5CDH* (8,6 y 2 veces más respectivamente) y una disminución significativa de *MtP5CS1* (8,6 veces menos). Sin embargo en la parte aérea de p18, tan solo se produjo un aumento significativo para *MtProDH* (4,7 veces más) en respuesta a Cd, mientras que la acumulación de *MtP5CS2*, *MtP5CDH*, *MtOAT* y *ProT* disminuyó significativamente en presencia del metal (5, 3, 5,5 y 4 veces respectivamente). En el WT (Figura 28B), las raíces tratadas mostraron un

fuerte aumento de la acumulación en los transcritos de *MtProDH* y *MtP5CDH* (4,6 y 7,9 veces, respectivamente) y una disminución de *MtOAT* de 2,6 veces. En la parte aérea de estas plántulas, el Cd aumentó 4,3, 3,4 y 2,8 veces la expresión de *MtP5CS2*, *MtP5CDH* y *ProT*, respectivamente y reprimió 3,6 y 12 veces la expresión de *MtProDH* y *MtOAT*, respectivamente.

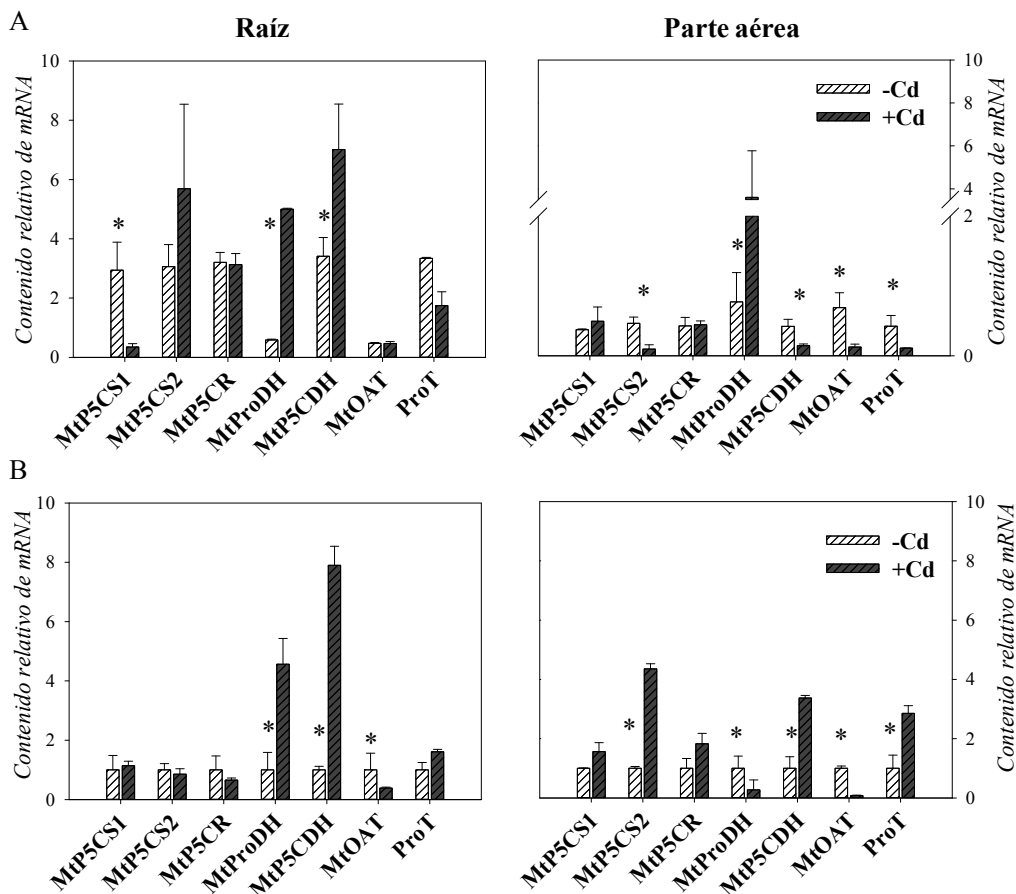


Figura 28. Análisis de los patrones de expresión de componentes del metabolismo de la prolina en plántulas de la línea transgénica p18 (A) y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT) (B), sometidas a 0 ó 50 μM CdCl_2 durante 12h. Las barras indican la desviación estándar (n=4). *Factores de cambio > 2. Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa 1 (*P5CS1*); Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa 2 (*P5CS2*); Pirrolina-5-carboxilato reductasa (*P5CR*); Prolina deshidrogenasa (*ProDH*); Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (*P5CDH*); Ornitina δ -aminotransferasa (*OAT*); Transportador de prolina (*ProT*).

El segundo grupo de genes analizados se centró en las enzimas antioxidantes SOD y CAT, que ya en ausencia de Cd mostraron expresión diferencial entre p18 y WT (Figura 29). La línea transgénica p18 mostró mayores niveles de mRNA para *MtFeSOD*, *MtMnSOD* y *MtCAT* (2,2, 2,3 y 11 veces más, respectivamente) que el WT en las raíces sin tratar, y 2,2 veces más transcrito de *MtCuZnSODa* en la parte aérea de p18 que en la del WT sin tratar. En ausencia de Cd, en la parte aérea de p18 se encontraron contenidos

de mRNA de *MtFeSOD* y *MtCAT* significativamente menores (4,5 y 2,4 veces, respectivamente) que en la parte aérea del WT.

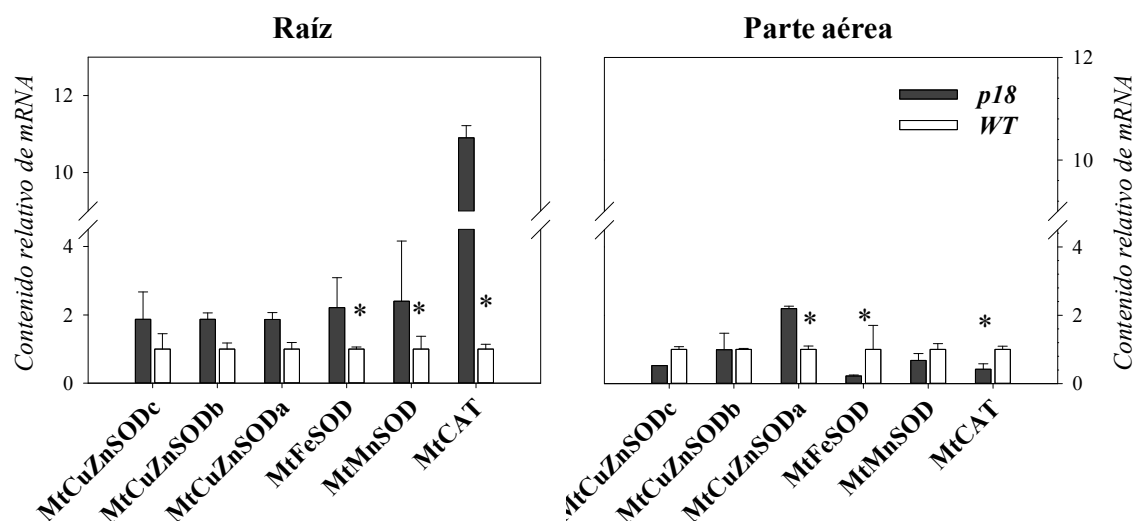


Figura 29. Análisis de los patrones de expresión de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en plántulas de la línea transgénica p18 y *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), en 0 μ M de CdCl_2 durante 12 h. Las barras indican la desviación estándar (n=4). *Factores de cambio > 2. *Superóxido dismutasa (SOD)*; *Catalasa (CAT)*.

El tratamiento con Cd causó en las raíces de la línea p18 (Figura 30A) un descenso de 3,3 y 2,1 veces en la acumulación del transcrito de *MtCuZnSODa* y *MtMnSOD*, respectivamente, y un aumento de la expresión de *MtFeSOD* de 2,1 veces. Tan sólo se observó incremento de la acumulación de mRNA para el transcrito de *MtCuZnSODa* (2,1 veces) en la parte aérea de p18 expuesta a Cd. En el WT (Figura 30B), el Cd disminuyó 3 y 3,4 veces la acumulación de mRNA para los transcritos *MtCuZnSODa* y *MtCAT* y causó un aumento de 8 veces en la expresión de *MtFeSOD* en las raíces, mientras que en la parte aérea del WT, el tratamiento promovió una acumulación de 2,2, 7 y 4 veces para los transcritos de *MtCuZnSODb*, *MtCuZnSODa* y *MtCAT*.

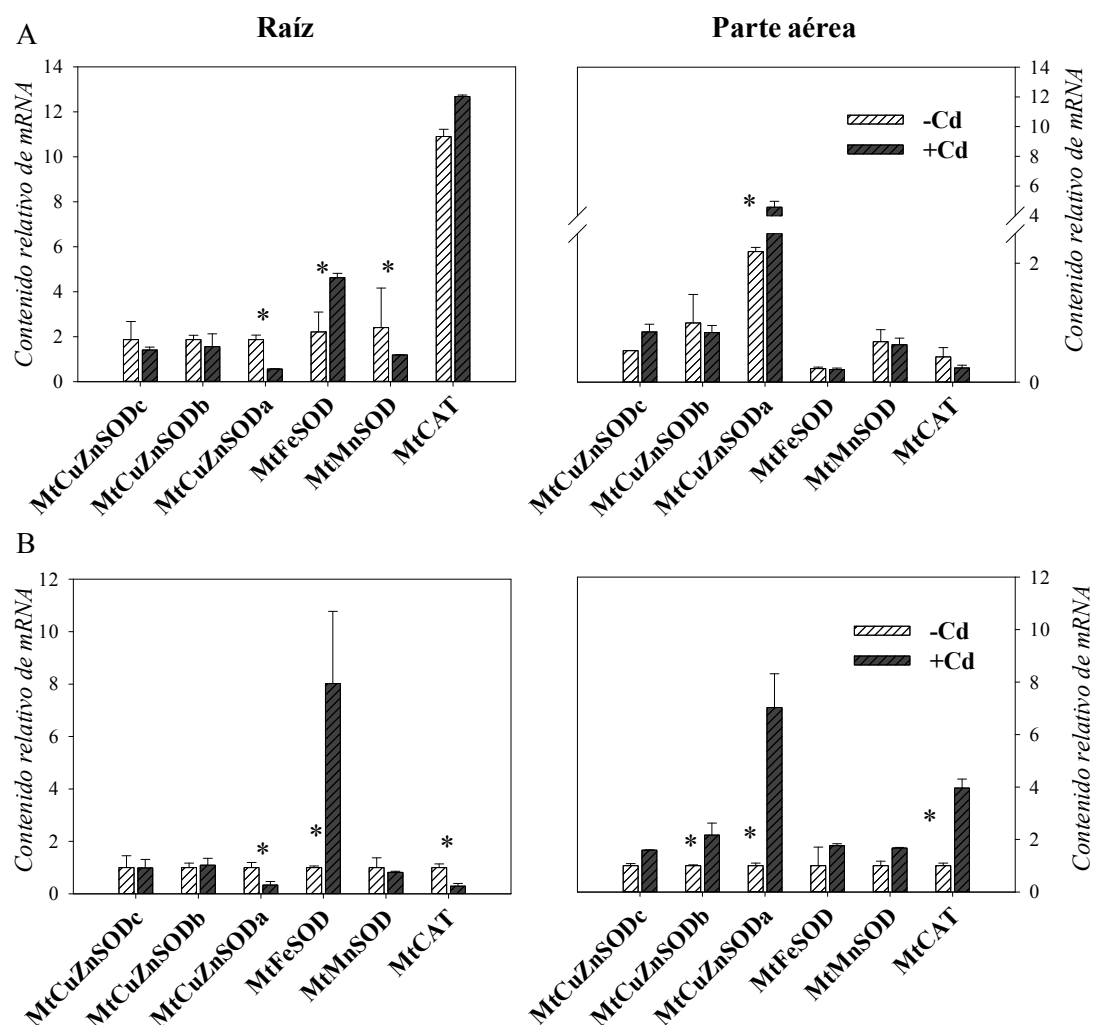


Figura 30. Análisis de los patrones de expresión de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en plántulas de la línea transgénica p18 (A) y *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT) (B), sometidas a 0 ó 50 µM CdCl₂ durante 12h. Las barras indican la desviación estándar (n=4). *Factores de cambio > 2. Superóxido dismutasa (SOD); Catalasa (CAT).

En el tercer grupo de genes analizado, centrado en la biosíntesis de glutatión y fitoquelatinas, de nuevo se observaron diferencias en las expresiones basales entre ambas líneas ya en ausencia de Cd (Figura 31). Todos los transcritos en las raíces de p18 mostraron mayores contenidos de mRNA que en las raíces del WT (*MtCYS*, *MtgECS*, *MtGSHS*, *MthGSHS*, *MtPCS* y *MtGPX* con 10,2, 9,3, 9,7, 11, 4,3, y 2,8 veces más respectivamente) y en la parte aérea de p18 tan solo *MthGSHS* y *MtPCS* mostraron menor contenido de mRNA (2,3 y 2,8 veces, respectivamente) que en la parte aérea del WT.

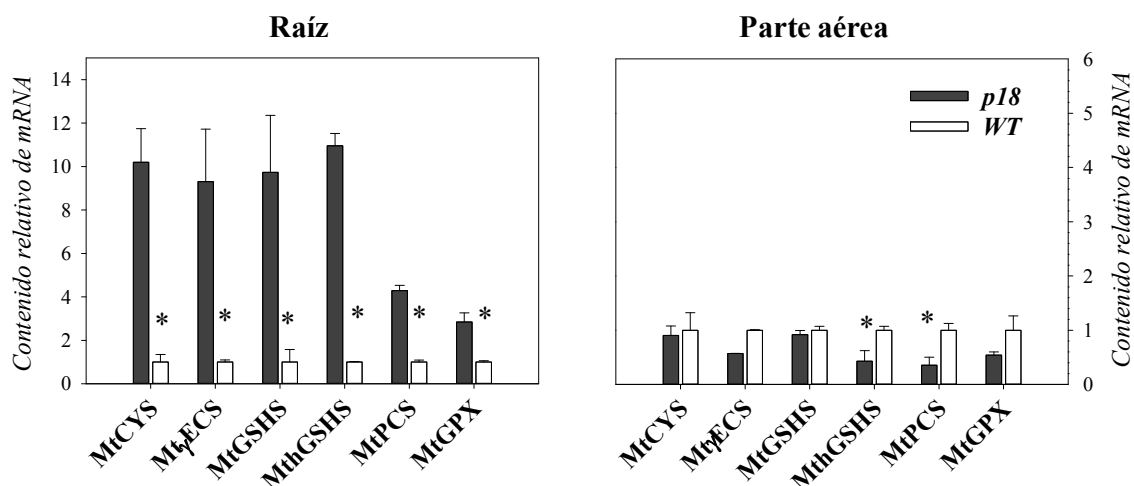


Figura 31. Análisis de los patrones de expresión de los principales genes implicados en la biosíntesis de glutatión y fitoquelatinas en plántulas de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), en 0 μM de CdCl_2 durante 12 h. Las barras indican la desviación estándar ($n=4$). *Factores de cambio > 2 . Cisteína sintasa (CYS); γ -glutamilcisteína sintetasa (γ ECS); Glutatión sintetasa (GSHS); Homoglutatión sintetasa (hGSHS); Fitoquelatina sintasa (PCS); Glutatión peroxidasa (GPX)

El tratamiento con Cd (Figura 32A) aumentó la expresión de *MtGSHS* 2,6 veces y promovió la disminución en la acumulación de los transcritos de *MtCYS*, *MthGSHS* y *MtGPX* (2,6, 10 y 4,3 veces, respectivamente) en las raíces de p18, mientras que no afectó significativamente a la expresión de ningún transcrito en la parte aérea. En las raíces de WT expuesto a Cd (Figura 32B), se observó un aumento de 3,4, 7, 9 y 3,5 veces en la acumulación de los transcritos *MtCYS*, *MtgECS*, *MtGSHS* y *MtPCS*, respectivamente y *MtGSHS* redujo su expresión 4,7 veces. Finalmente, el Cd causó un aumento de 2,2, 2,4 y 2,7 veces en la acumulación de mRNA para los transcritos de *MtCYS*, *MtgECS* y *MtGSHS* en la parte aérea del WT.

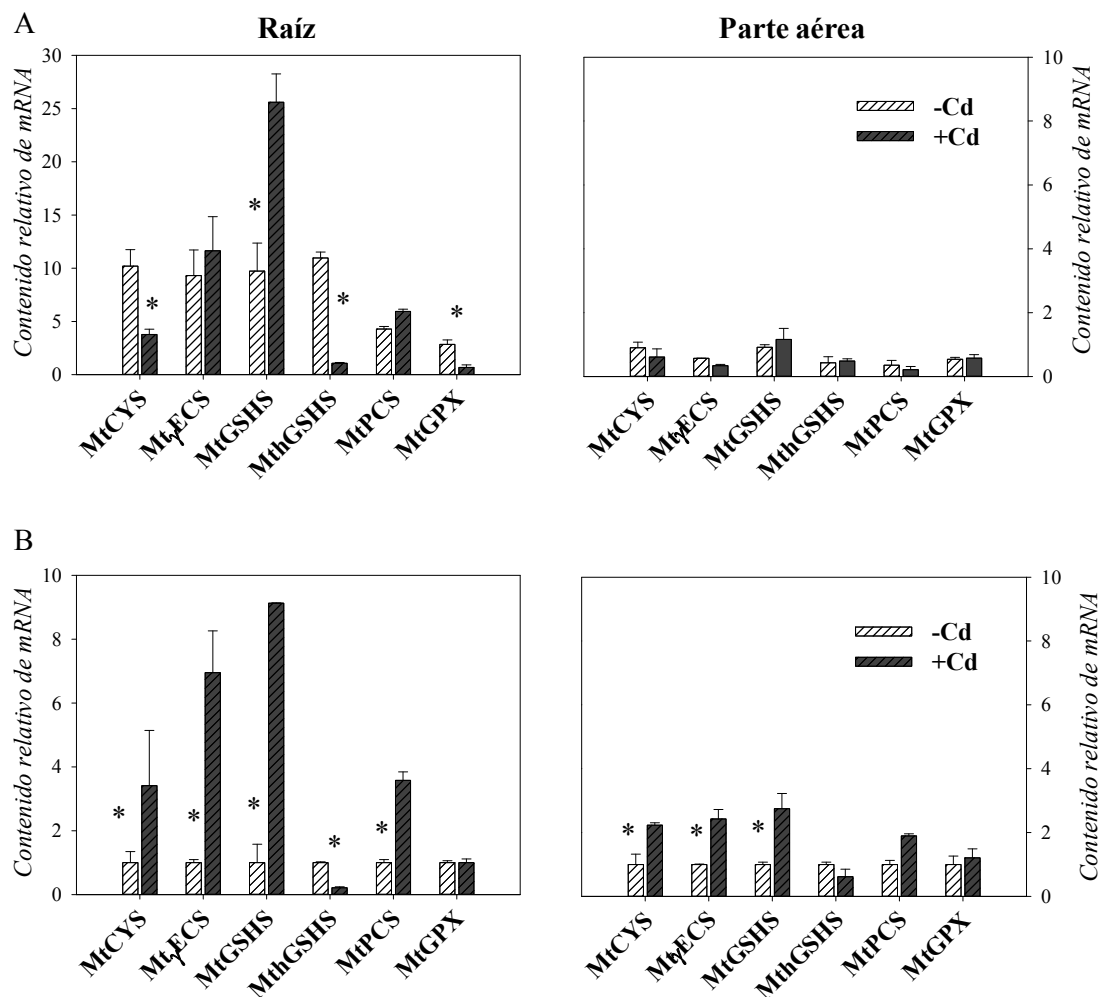


Figura 32. Análisis de los patrones de expresión de los principales genes implicados en la biosíntesis de glutatión y fitoquelatinas en plántulas de la línea transgénica p18 (A) y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT) (B), sometidas a 0 ó 50 μM CdCl_2 durante 12h. Las barras indican la desviación estándar ($n=4$). *Factores de cambio > 2 . Cisteína sintasa (CYS); γ -glutamilcisteína sintetasa (γECS); Glutatión sintetasa (GSHS); Homoglutatión sintetasa ($h\text{GSHS}$); Fitoquelatina sintetasa (PCS); Glutatión peroxidasa (GPX).

Por último, se analizaron los patrones de expresión de los genes relacionados con el ciclo ASC-GSH y los genes relacionados con la generación de NADPH, observándose nuevamente diferencias en la expresión basal entre las raíces de ambas líneas en ausencia de Cd (Figura 33). En la línea p18 todos los transcritos mostraron mayores niveles de expresión, con 10, 2,3, 3,7, 3,5, 9,4 y 3,5 veces más contenido de mRNA que en las raíces del WT para *MtGR*, *MtMR*, *MtGalLDH*, *MtG6PDH*, *Mt6PGDH* y *MtICDH* respectivamente. Por el contrario no se observaron diferencias significativas en los patrones de expresión entre WT y p18 en la parte aérea.

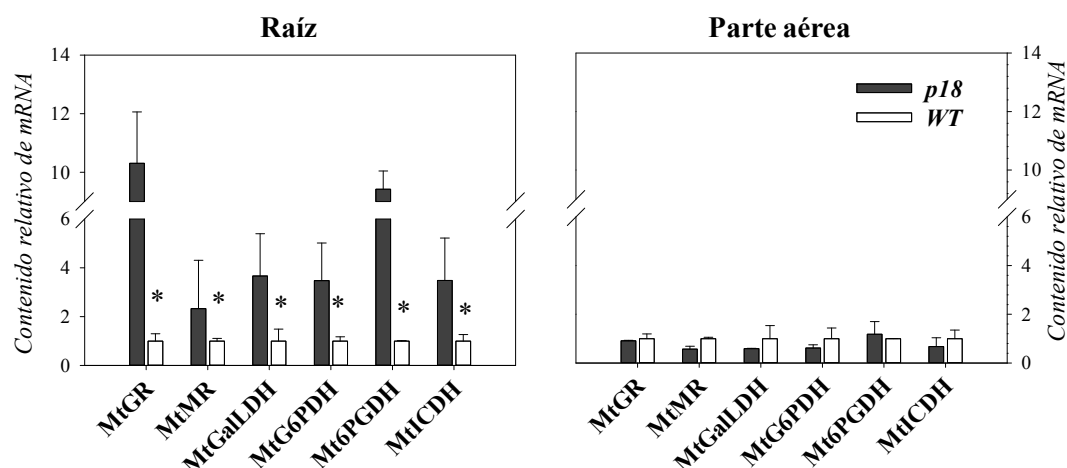


Figura 33. Análisis de los patrones de expresión de los principales genes implicados en la biosíntesis de ascorbato y NADPH en plántulas de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), en 0 μ M de CdCl_2 durante 12 h. Las barras indican la desviación estándar (n=4). *Factores de cambio > 2. *Glutación reductasa* (GR); *Monodehidroascorbato reductasa* (MR); *Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa* (GalLDH); *Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* (G6PDH); *6-fosfogluconato deshidrogenasa* (6PGDH); *Isocitrato deshidrogenasa* (ICDH).

En las raíces de p18 el Cd (Figura 34A) redujo 3,2 y 2,7 veces la acumulación de mRNA para los transcritos de *MtMR* y *MtG6PDH* y en la parte aérea el tratamiento también causó una reducción en la expresión de los transcritos de *MtG6PDH* y *MtICDH* de 2,3 y 5,7 veces. Tan solo el transcrito de *MtGalLDH* mostró 12 veces mayor acumulación de mRNA en la parte aérea de p18 expuesta al metal.

Por último, el Cd causó en las raíces del WT (Figura 34B) una importante acumulación de mRNA para *MtGR* y *MtG6PDH* (3,4 y 5,2 veces), aumentó 2 veces la expresión de *MtICDH*, y disminuyó 2,4 veces la expresión de *MtGalLDH*, mientras que en la parte aérea del WT, el Cd provocó un incremento de 6 y 4 veces en la expresión de *MtGR* y *MtG6PDH* respectivamente y una reducción de 2,7 veces en el contenido de mRNA para *MtGalLDH*.

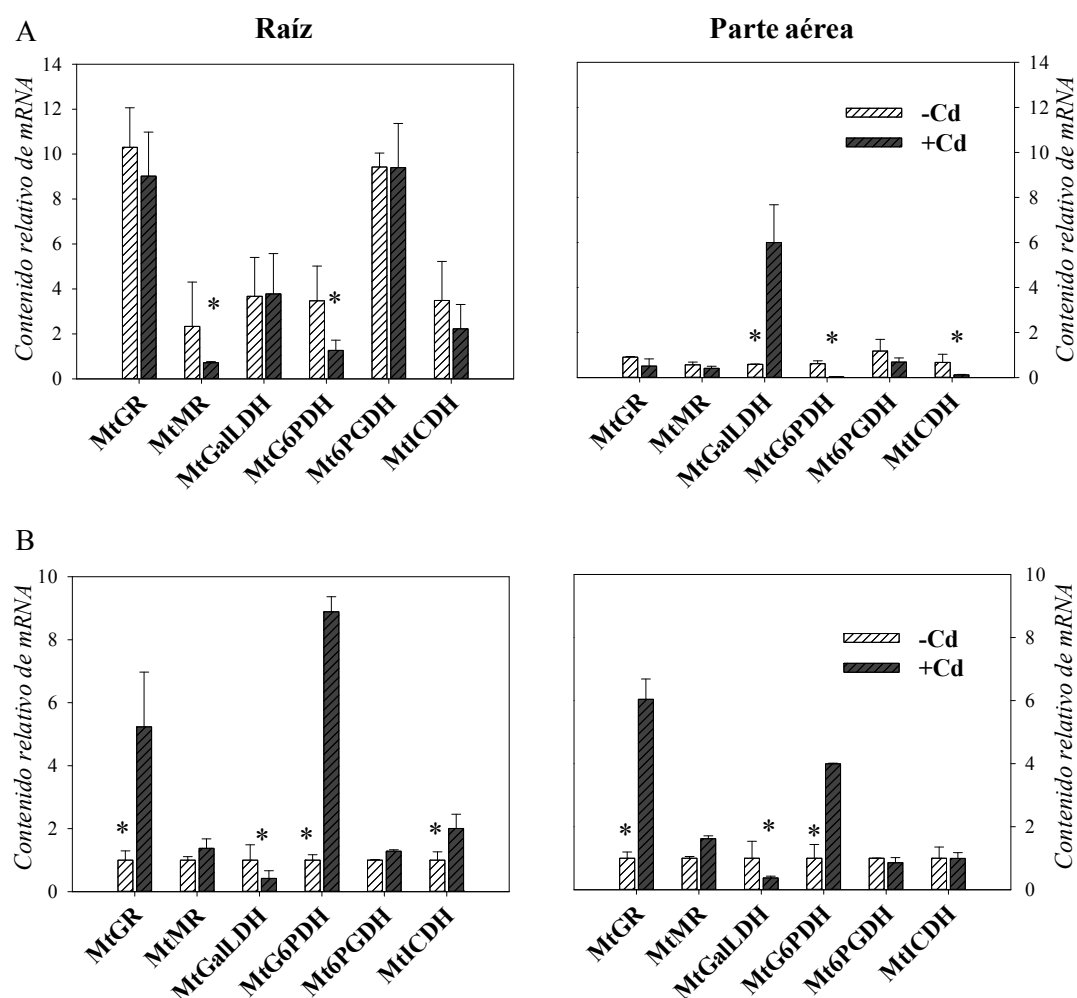


Figura 34. Análisis de los patrones de expresión de los principales genes implicados en la biosíntesis de ascorbato y NADPH en plántulas de la línea transgénica p18 (A) y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT) (B), sometidas a 0 ó 50 μM CdCl_2 durante 12h. Las barras indican la desviación estándar ($n=4$). *Factores de cambio > 2 . *Glutación reductasa* (GR); *Monodehidroascorbato reductasa* (MR); *Galactono-1,4-lactona deshidrogenasa* (GalLDH); *Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* (G6PDH); *6-fosfogluconato deshidrogenasa* (6PGDH); *Isocitrato deshidrogenasa* (ICDH).

3.4. Efecto del Cd en plantas de *M. truncatula* p18 y WT crecidas en contenedores forestales

Para evaluar el efecto del Cd sobre las plantas en un estadio de desarrollo más avanzado, la línea transgénica p18 y el WT fueron expuestas a diferentes concentraciones de Cd (0–1 mM CdCl_2), durante 32 días en contenedores forestales con soporte de vermiculita, determinándose los porcentajes de supervivencia y cosechándose el material expuesto a 0 ó 100 μM de CdCl_2 , para evaluar el estado fisiológico, el contenido de nutrientes, la acumulación de Cd y los factores de traslocación del metal, la capacidad antioxidante y el daño oxidativo en las plantas.

3.4.1. Supervivencia

El Cd causó disminución de la supervivencia en ambas líneas en los tratamientos de concentración superior a 0,1 mM de CdCl₂ (Figura 35). Sin embargo, el efecto no fue igual en ambas; la línea transgénica mostró en torno a un 90%, 60%, 50% y 40% de supervivencia en exposición a 0,2, 0,4, 0,6 y 1 mM de CdCl₂ respectivamente, mientras que no sobrevivió ninguna planta WT a partir de 0,4 mM de CdCl₂.

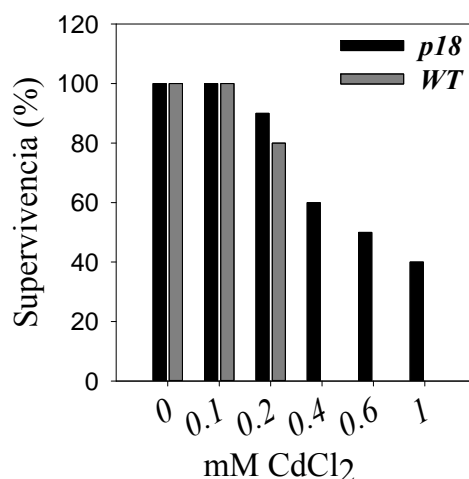


Figura 35. Porcentajes de supervivencia de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), expuestas a diferentes concentraciones de Cd (0-1 mM CdCl₂) en contenedores forestales durante 32 días.

3.4.2. Efecto del Cd sobre el estado fisiológico de *M. truncatula* p18 y WT

Se midieron el número de hojas, la longitud de la raíz principal, los pesos frescos y secos de la raíz y de la parte aérea, en la línea transgénica p18 y el WT expuestos a 0 ó 100 μ M de CdCl₂, durante 32 días en contenedores forestales (Figura 30B). El contenido de clorofilas se determinó mediante un medidor de clorofilas portátil (Materiales y Métodos 6). Todos los valores fueron relativizados con respecto al control (ausencia de Cd).

La línea transgénica p18 mostró un mejor estado fisiológico en presencia de Cd que el WT (Figura 36), puesto que en p18 todos los parámetros determinados en condiciones de estrés por Cd mostraron valores significativamente superiores a los observados para el WT, a excepción del RRG, que alcanzó en torno al 80% para ambas líneas en exposición al metal. La línea p18 en presencia de Cd presentó valores de RNL (35% más que el WT), de RRFW (20% más), de RRDW (16% más), de RSFW (15% más), de RSDW (24% más) y de contenido relativo de clorofilas (RRC; 19% más), superiores al WT.

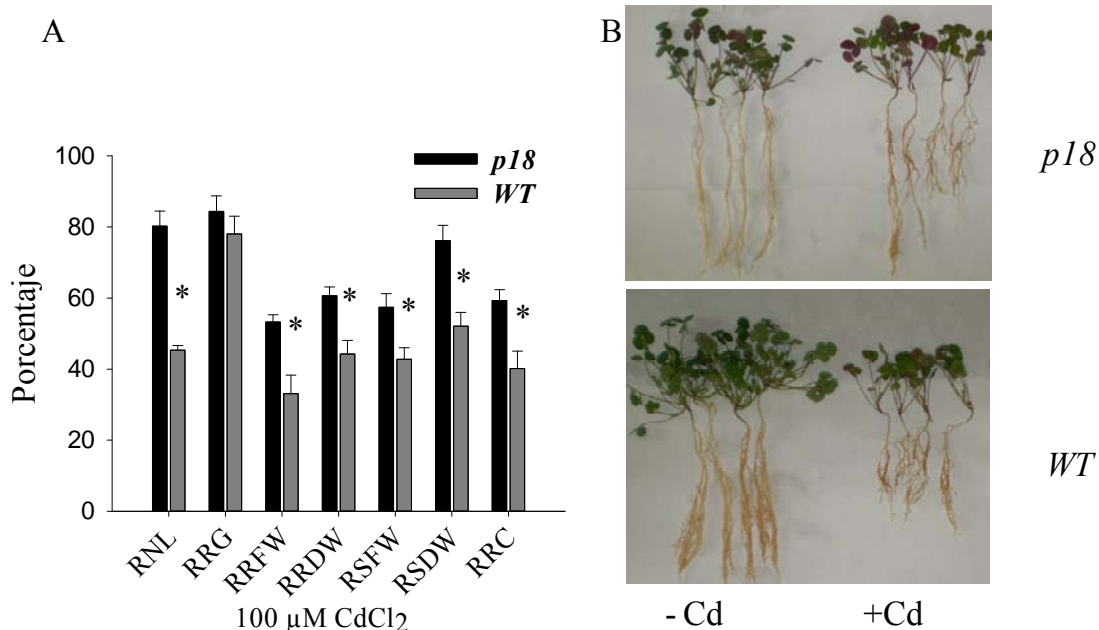


Figura 36. Parámetros morfológicos relativos al control (ausencia de Cd) en plantas de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), sometidas a 0 ó 100 μM de CdCl_2 , en contenedores forestales durante 32 días (A) e imagen de dichas plantas (B). Número relativo de hojas (RNL); crecimiento relativo de la raíz principal (RRG); pesos frescos relativos de la raíz (RRFW) y de la parte aérea (RSFW); pesos secos relativos de la raíz (RRDW) y de la parte aérea (RSDW); contenido relativo de clorofila (RCC). Las barras indican el error estándar. *Diferencias significativas entre las líneas (ANOVA multivariante, $p < 0,05$, $n = 5-10$).

3.4.3. Efecto del Cd sobre el estado nutricional de *M. truncatula* p18 y WT

Se determinaron los contenidos de nutrientes (K, Ca, Na, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn, Cu) en las raíces y la parte aérea de la línea transgénica p18 y de WT sometidas a 0 ó 100 μM CdCl_2 , durante 32 días en contenedores forestales (Tabla 13).

El tratamiento con Cd promovió en las raíces de línea p18 un aumento significativo en el contenido de K, Ca y Na, mientras que el S y el Mg fueron afectados negativamente y el P no sufrió ningún cambio, en presencia de Cd. Los micronutrientes también se vieron afectados por la presencia del metal en las raíces de la línea p18, mostrando una disminución significativa del contenido de Fe y Mn, mientras que el Zn y el Cu aumentaron significativamente su contenido. En la parte aérea de p18, el Cd afectó negativamente al contenido de Ca, S y Zn, aumentó significativamente el contenido de Na y no provocó ningún cambio en el resto de nutrientes.

En las raíces del WT el tratamiento con Cd afectó de manera similar a la observada en p18, con excepción del P que redujo su acumulación significativamente en presencia de Cd, el Mn que no sufrió ningún cambio significativo. En la parte aérea del WT el

tratamiento con Cd no provocó variaciones en el contenido de Ca y S, pero sí disminuyó significativamente el contenido de K, P, Zn y Cu y causó un aumento del contenido en Na y Mg.

Comparando los contenidos nutricionales observados entre ambas líneas, encontramos patrones diferenciales en ausencia y en presencia de Cd.

En las raíces en ausencia de Cd, el WT mostró un contenido significativamente superior de P y S al observado en p18, pero en presencia del metal la línea p18 mostró un contenido significativamente mayor de P en las raíces que el WT y no se encontraron diferencias significativas entre ambas líneas en el contenido de S en las raíces tratadas. Además, el Zn y el Cu en ausencia de Cd mostraron un contenido significativamente mayor en las raíces de la línea p18 que en el WT y esta tendencia se mantuvo en presencia de Cd. El contenido de Mn fue semejante en ausencia de Cd para ambas líneas, sin embargo, en presencia del metal las raíces de WT mostraron un contenido de Mn superior a las de p18.

En la parte aérea, comparando entre líneas, aunque el P en ausencia de Cd mostró un contenido menor en la línea p18 que en el WT, en condiciones de estrés por Cd era la línea p18 la que mostraba mayor contenido de este elemento. Por el contrario, el Ca en ausencia de Cd mostró un contenido mayor en la línea p18 que en el WT, mientras que en condiciones de estrés por Cd no se encontraron diferencias significativas en el contenido de este elemento para ambas líneas. El Na en la parte aérea de la línea p18 mostró un contenido mayor que en el WT tanto en presencia como en ausencia de Cd y el Mg y el S no mostraron diferencias significativas en su contenido entre ambas líneas en ausencia de Cd, pero estos elementos si se acumularon significativamente menos en la parte aérea de la línea p18 que en el WT en presencia de Cd. Finalmente, el Zn mostró una acumulación en la parte aérea de la línea p18 en ausencia de Cd significativamente superior a la observada en el WT y el Cu mostró una acumulación en la parte aérea de la línea p18 en presencia de Cd significativamente superior a la observada en el WT.

Tabla 13. Contenido de nutrientes de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), sometidas a 0 ó 100µM de CdCl₂, en contenedores forestales durante 32 días.

Nutriente	Tratamiento	Raíz		Parte aérea	
	CdCl ₂ (μM)	<i>p18</i>	<i>WT</i>	<i>p18</i>	<i>WT</i>
Macronutrientes (μg/g)					
K	0	49442 bA	46500 bA	53112 aB	62701 aA
	100	55182 aA	58797 aA	51908 aA	51769 bA
Ca	0	1384 bA	1293 bA	4267 aA	3634 aB
	100	1675 aA	1771 aA	3177 bA	3430 aA
Na	0	2235 bA	2230 bA	1028 bA	858 bB
	100	2956 aA	3147 aA	1775 aA	1292 aB
Mg	0	10458 aA	10069 aA	12214 aA	11246 bA
	100	8113 bA	9729 bA	11418 aB	13276 aA
P	0	1077 aB	1210 aA	1953 aB	2128 aA
	100	1233 aA	741 bB	1870 aA	1898 bA
S	0	2610 aB	5781 aA	4423 aA	4240 aA
	100	857 bA	1796 bA	2198 bB	4436 aA
Micronutrientes (μg/g)					
Fe	0	1104 aA	943 aA	90 aA	70 aA
	100	696 bA	445 bA	75 aA	73 aA
Mn	0	233 aA	183 aA	40 aA	37 aA
	100	88 bB	162 aA	39 aA	47 aA
Zn	0	33 bA	20 bB	16 aA	11 aB
	100	35 aA	26 aB	7 bA	5 bA
Cu	0	56 bA	31 bB	17 aA	16 aA
	100	87 aA	63 aB	19 aA	12 bB

Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada órgano; Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre líneas para cada órgano (ANOVA de una vía, $p \leq 0,05$, $n=3-5$).

3.4.4. Contenido en Cd y porcentaje de traslocación

La concentración de Cd se determinó en las mismas plantas (raíz y parte aérea) que en la sección anterior y los datos se utilizaron para calcular el porcentaje de traslocación de Cd de la raíz a la parte aérea (%TF).

La línea transgénica mostró una acumulación de Cd significativamente superior a la observada en el WT tanto en la raíz como en la parte aérea; sin embargo fue el WT quién presentó mayor porcentaje de traslocación (Tabla 14).

Tabla 14. Contenido en Cd y porcentaje de traslocación (%TF) en plantas de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), sometidas a 100µM de CdCl₂, en contenedores forestales durante 32 días. Se indica la media ± desviación estándar.

Línea	[Cd] mg/kg		%TF
	Raíz	Parte aérea	
<i>p18</i>	467,51 ± 9,74 a	70,13 ± 3,6 a	4,77
<i>WT</i>	893,56 ± 10,28 b	62,03 ± 8,84 b	6,64

Las diferentes letras indican diferencias significativas entre líneas para cada tejido (ANOVA de una vía, $p \leq 0,05$, $n = 5-6$).

3.4.5. Capacidad antioxidante y daño oxidativo en respuesta a Cd en *M. truncatula* p18 y WT

Se evaluó la capacidad antioxidante de la línea transgénica p18 y el WT sometidas a 0 ó 100 µM CdCl₂ durante 32 días en contenedores forestales. Para ello se midió el contenido de glutatión (GSSG, GSH y GSH/GSSG), el contenido de prolina y las actividades SOD y CAT. El daño oxidativo producido por el Cd se evaluó mediante la peroxidación de lípidos (contenido de MDA).

En las raíces (Figura 37A) el Cd redujo significativamente el contenido de glutatión oxidado (GSSG) en el WT, sin embargo no afectó al contenido de GSSG en la línea p18. Por el contrario, el Cd provocó un aumento significativo del contenido de GSH en las raíces de la línea p18, pero no afectó significativamente el contenido de GSH en el WT. Atendiendo a la relación GSH/GSSG, esta se mantuvo constante en las raíces de la línea p18 expuesta a Cd, mientras que aumentó de manera significativa, en las raíces de WT expuesto a Cd.

En la parte aérea (Figura 37B) el Cd no produjo ningún cambio significativo en el contenido de GSSG para ninguna de las líneas y se redujo significativamente el contenido de GSH en la parte aérea del WT. En cuanto a la relación GSH/GSSG, al igual que en las raíces, se mantuvo sin variaciones significativas en la parte aérea de la línea p18 y aumentó significativamente en la parte aérea del WT.

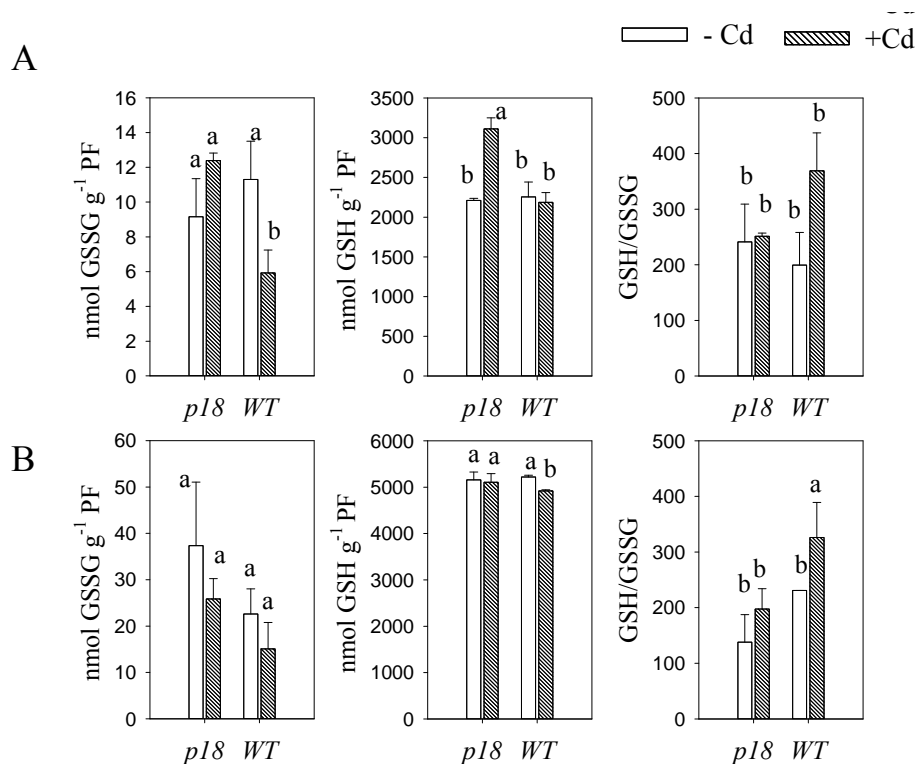


Figura 37. Contenido de glutatión oxidado (GSSG), glutatión reducido (GSH) y relación GSH/GSSG en las raíces (A) y la parte aérea (B) de plantas de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), sometidas a 0 ó 100 μ M de CdCl₂, en contenedores forestales durante 32 días. Las barras indican la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test Tukey HSD, $p \leq 0,05$, $n = 4$).

El contenido de prolina (Figura 38A) en la línea transgénica p18 fue significativamente mayor que en el WT, en ambos órganos en ausencia de Cd, manteniéndose constante en condiciones de stres por Cd. El WT mostró unos niveles muy bajos de prolina en las raíces, aunque permanecieron sin variaciones significativas en presencia del metal; por el contrario, en la parte aérea el Cd provocó un aumento significativo en el contenido de prolina en el WT, aunque no alcanzó los niveles de la parte aérea de p18.

No se observaron diferencias significativas en la actividad total SOD (Figura 38B) en presencia de Cd para ninguna de las líneas, sin embargo en ausencia de Cd el WT mostró una actividad total SOD significativamente superior a p18. La actividad CAT (Figura 38C) fue similar para las raíces de ambas líneas en ausencia de Cd. Sin embargo el Cd no causó ningún cambio significativo en la actividad CAT para las raíces de p18 y por el contrario provocó una disminución significativa de la actividad de esta enzima en el WT. En la parte aérea en ausencia de estrés, la actividad CAT en la línea p18 fue ligeramente menor, aunque no significativa, que en el WT y el Cd provocó un aumento

de la actividad de la enzima en ambas líneas, significativo para la línea transgénica p18 y no significativo para el WT.

Por último, el contenido de MDA (Figura 38D) en raíces del WT fue significativamente superior al contenido de MDA en raíces de la línea p18 en ausencia de Cd, y aunque el tratamiento aumentó significativamente la acumulación de MDA en las raíces de ambas líneas, el contenido de MDA fue significativamente superior en las raíces tratadas del WT. La parte aérea del WT en ausencia de Cd mostró niveles significativamente superiores de MDA en comparación con la línea p18 y el Cd también promovió un aumento significativo en la acumulación de MDA en la parte aérea de ambas líneas. En presencia de Cd, los niveles de MDA observados en el WT (en la raíz y la parte aérea) fueron significativamente mayores que los observados en el p18.

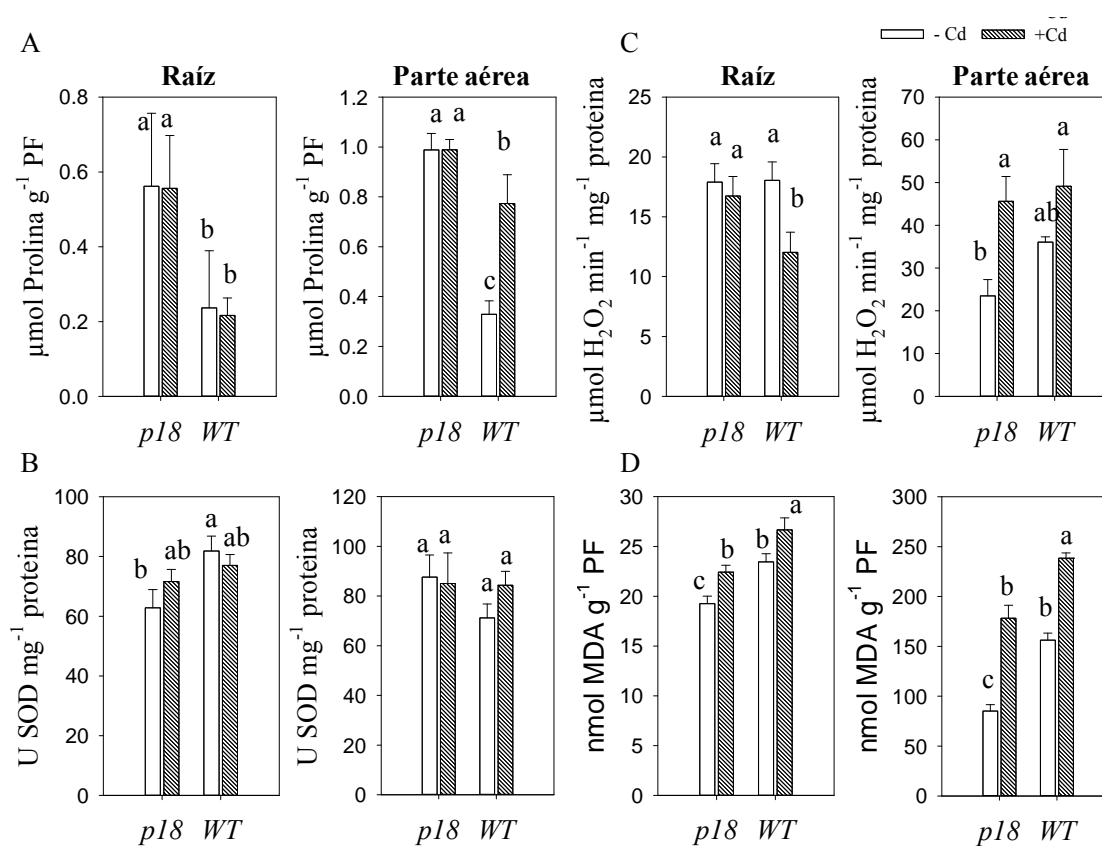


Figura 38. Contenido de prolina (A), actividad SOD (B), actividad CAT (C) y peroxidación de lípidos (D), en plantas de la línea transgénica p18 y de *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) (WT), sometidas a 0 ó 100 μM de CdCl_2 , en contenedores forestales durante 32 días. Las barras indican la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas (Test Tukey HSD, $p \leq 0,05$, $n = 4$).

4. MicroRNAs en respuesta a Cd en *M. truncatula*

Para evaluar el posible papel de los microRNAs (miRNAs) en la respuesta a Cd en *M. truncatula*, se seleccionaron 7 miRNAs (Tabla 6; Materiales y Métodos 10.1.) que respondían a diferentes condiciones bióticas y abióticas en ápices de *M. truncatula* (Formey *et al.*, 2014).

4.1. Efecto del Cd sobre la expresión de los miRNAs en los cultivares *CdT* y *CdS*

Se determinaron los patrones de expresión de los 7 nmiRNAs mediante qRT-PCR (Figura 39) en raíces de los cultivares *CdT* (PI 516929; tolerante a Cd) y *CdS* (W6 6142; sensible a Cd) expuestos a 0 ó 50 μM CdCl_2 , durante 0, 6 y 10 h en sistema hidropónico miniaturizado.

Tanto para *CdS* como para *CdT*, en ausencia de Cd no se encontraron variaciones en los niveles de expresión de los miRNAs a 0, 6 y 10 horas, por lo que los niveles de expresión en ausencia de Cd a 0h se utilizaron como control en las figuras 39 y 40.

En ausencia de Cd, los únicos miRNAs que mostraron expresión diferencial entre *CdS* y *CdT* fueron nmiR2 y nmiR5, mostrando en *CdT* niveles de expresión de 6,4 y 3,2 veces superiores, respectivamente, a los observados en *CdS*, y nmiR4 que mostraba niveles de expresión en *CdS* 8 veces superior al los observados en *CdT* en ausencia de Cd (Figura 39).

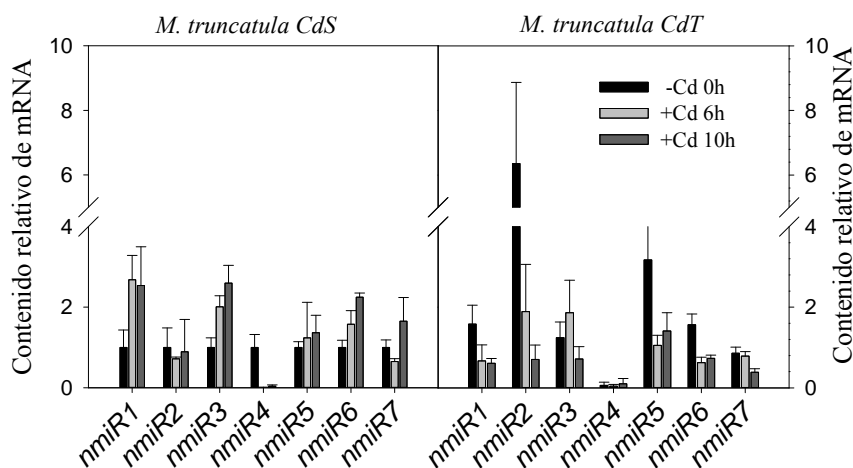


Figura 39. Patrones de expresión de 7 miRNAs en raíces de los cultivares de *M. truncatula*; tolerante a Cd (*CdT*) y sensible (*CdS*), expuestos a 50 μM CdCl_2 durante 0, 6 y 10h. Las barras indican la desviación estándar (n=4).

El tratamiento con Cd produjo una expresión diferencial de los miRNAs en *CdS* y *CdT*, observándose en *CdS* un incremento de expresión significativo para nmiR1 y nmiR3 (2,7 y 2,2 veces, respectivamente) ya a las 6 h de tratamiento. A las 10h, el contenido relativo de mRNA para estos nmiR se mantuvo, para nmiR 6 se incrementó

2,2 veces, y se apreció un ligero aumento, aunque no significativo, de la expresión para el nmiR 7 (1,7 veces). Los nmiR2 y 5 no mostraron variaciones significativas de expresión a lo largo del experimento y el nmiR4 disminuyó 10 veces su expresión ya a las 6 h de tratamiento, manteniéndose estos niveles a las 10 h. Por el contrario, todos los microRNAs que incrementaron su expresión en *CdS* en presencia de Cd redujeron su expresión en *CdT* en presencia de Cd (significativa o levemente), observándose para nmiR1, 2, 3, 5, 6 y 7 niveles 2,6, 9, 1,8, 3, 2,5 y 2,3 veces menores, respectivamente, que en ausencia de Cd.

4.2. Efecto del Cd sobre la expresión de los genes diana de nmiR3 en *CdT* y *CdS*

Atendiendo a los genes diana de los nmiR, los cuales fueron identificados mediante el análisis del degradoma de ápices de *M. truncatula* sometida a diferentes condiciones bióticas y abióticas (Formey *et al.*, 2014), se concluyó que el miRNA más interesante para nuestro estudio era el nmiR3, por tener como diana algunos genes que podrían estar relacionados con la respuesta de la planta a metales pesados.

Se determinaron los patrones de expresión de los genes diana del nmiR3 mediante qRT-PCR, en raíces de *CdT* y *CdS* expuestas a 0 ó 50 μ M CdCl₂, durante 0, 6 y 10 h en sistema hidropónico miniaturizado. Se estudiaron genes que correspondían a una esterasa/lipasa (GDLS), pseudouridina sintasa (PUS), un factor de transcripción relacionado con la patogénesis (PRTF), una proteína de unión a iones metálicos (ATFP4) y una proteína de cohesión de cromátidas hermanas (PDS5) (Figura 40).

En el cultivar *CdS* todos los genes analizados mostraron niveles de mRNA inferiores a los observados en *CdT*, a excepción de *MtATFP4* en ausencia de Cd. En *CdS* tan solo *MtPRTF* fue afectado de manera significativa en presencia de Cd a las 10h, disminuyendo su expresión en 7,7 veces. En *CdT* el Cd promovió la acumulación de mRNA de los transcritos de *MtGDLS*, y *MtPDS5* (2,3 y 2,3 veces más a las 10h) y hasta 37 veces se incrementó el contenido de mRNA para *MtATFP4* ya a las 6 h de tratamiento. Aunque *MtPUS* y *MtPRTF* no aumentaron su expresión en *CdT* por la exposición a Cd, mostraron contenidos de mRNA significativamente superiores a los observados en *CdS* (en torno a 3-4 veces más). En *CdT*, el transcrito *MtGDLS* mostró un contenido 6 veces superior a *CdS* en ausencia de Cd, 10 veces superior a *CdS* a las 6h de exposición y 15 veces superior a *CdS* a las 10h de exposición. Por último, en *CdT* el transcrito *MtPDS5* mostró un contenido de mRNA 4 veces superior a *CdS* tanto en ausencia de Cd como a las 6h de exposición, y 9 veces superior a *CdS* a las 10h de exposición.

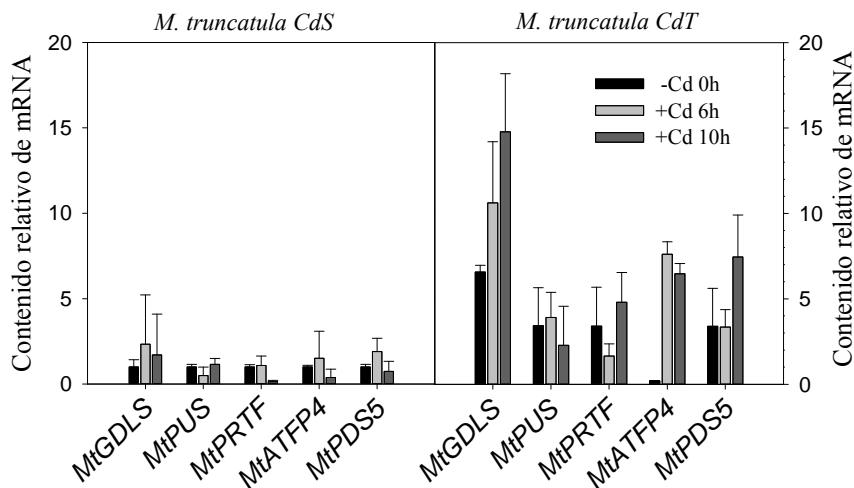


Figura 40. Patrones de expresión para los genes diana del nmiR3 en raíces de los cultivares de *M. truncatula*; tolerante a Cd (*CdT*) y sensible (*CdS*), expuestos a 50 μ M CdCl_2 durante 0, 6 y 10h. Las barras indican la desviación estándar ($n = 4$). *GDSL* esterasa/lipasa (*MtGDSL*); pseudouridina sintasa (*MtPUS*); factor de transcripción relacionado con la patogénesis (*MtPRTF*); proteína de unión a iones metálicos *ATFP4* (*MtATFP4-LP*); proteína de cohesión de cromátidas *PDS5* (*MtPDS5-A*).

4.3. Caracterización funcional de nmiR3 mediante raíces transgénicas de *M. truncatula* cv. Jemalong

Para averiguar si el nmiR3 estaba realmente relacionado con la sensibilidad a Cd, se obtuvieron plantas compuestas (raíz transgénica y parte aérea silvestre) de *M. truncatula* cv. Jemalong, mediante transformación con *A. rhizogenes*. Se realizaron tres tipos de transformación, una que inhibía la actividad del nmiR3 (MIM3), una que sobreexpresaba el nmiR3 (nmiR3-OE) y una transformación con el vector vacío como control. Las plantas con las raíces transgénicas fueron expuestas en placa a 0 ó 75 μ M de CdCl_2 durante 7 días (Figura 41A), determinándose el estado fisiológico y los patrones de expresión de nmiR3 y sus genes diana en las raíces transgénicas.

4.3.1. Estado fisiológico de las raíces transgénicas en respuesta a Cd

Para evaluar el estado fisiológico de las raíces transgénicas se determinó el ratio de crecimiento de la raíz a lo largo del ensayo. Además, al final del ensayo se determinaron el contenido de agua y los pesos frescos y secos de la raíz (Figura 41B).

En ausencia de Cd no se observaron diferencias en la tasa de crecimiento de las

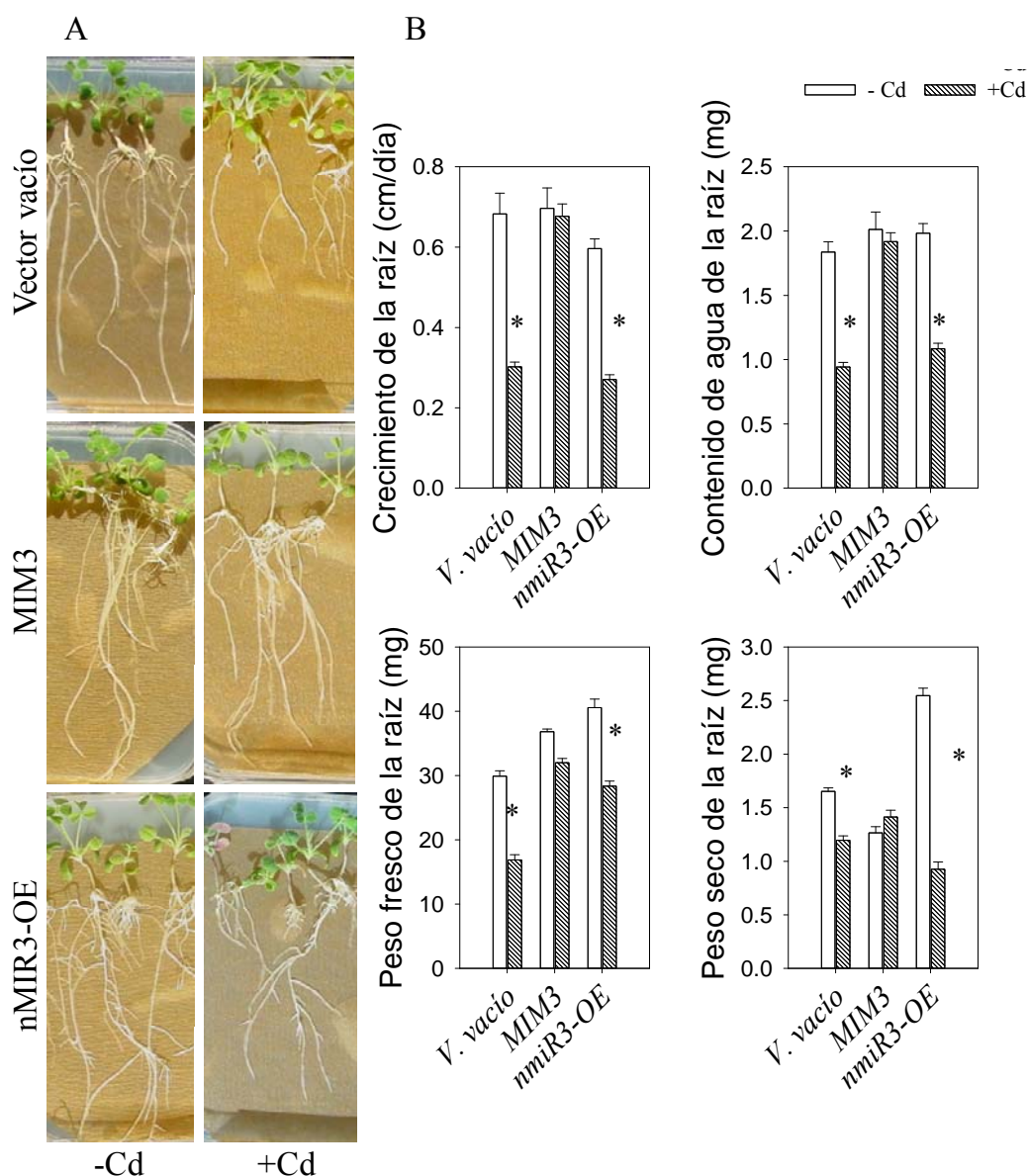


Figura 41. Raíces transgénicas de *M. truncatula* cv. Jemalong con actividad del nmiR3 inhibida (MIM 3), con sobreexpresión del nmiR 3 (nmiR3-OE) o con el vector vacío como control, sometidas a 0 ó 75µM de CdCl₂, durante 7 días (A). Crecimiento de la raíz, pesos frescos y secos y contenido de agua de las raíces transgénicas (B). Las barras indican el error estándar. * Diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA multivariante, p < 0,05, crecimiento de la raíz, n= 80; resto de medidas, n = 5-10).

raíces para ninguna construcción, mientras que el contenido de agua y los pesos fresco y seco en las raíces transformadas con la construcción nmiR-OE fueron significativamente superiores a las raíces transformadas con el vector vacío y la construcción MIM3. La exposición al metal redujo muy significativamente la tasa de crecimiento de las raíces en el control (vector vacío) así como en la transformación nmiR3-OE. La transformación que inhibe la actividad del nmiR3 (MIM3) mantuvo una tasa de crecimiento de raíz sin variaciones significativas entre ambos tratamientos. Esta

tendencia se mantuvo en el contenido de agua y los pesos secos y frescos, mostrando que el Cd no afectaba significativamente al desarrollo de las raíces en la construcción MIM3.

4.3.2. Patrones de expresión de nmiR3 y sus genes diana en las raíces transgénicas en respuesta a Cd

Se determinaron los patrones de expresión del nmiR3 (Figura 42) y sus genes diana (Figura 43) mediante qRT-PCR, en raíces transgénicas de las tres transformaciones (vector vacío, MIM 3 y nmiR3-OE) sometidas a 0 ó 75 μ M de CdCl₂, durante 7 días.

A los 7 días en ausencia de Cd ninguna de las transformaciones mostró diferencias significativas con respecto a la transformación con el vector vacío, sin embargo la transformación que inhibe el nmiR3 (MIM3) mostró un contenido de nmiR3 2,11 veces menor que la transformación nmiR3-OE.

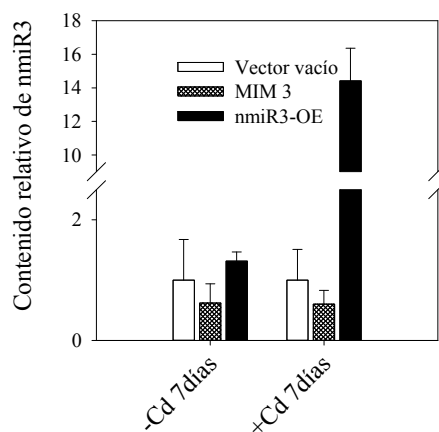


Figura 42. Expresión de nmiR3 en raíces transformadas de *M. truncatula* cv. Jemalong: con actividad del nmiR3 inhibida (MIM 3), con sobreexpresión del nmiR 3 (nmiR3-OE) o con el vector vacío como control, en 0 ó 75 μ M de CdCl₂, durante 7 días. Las barras indican el error estándar (n=4).

En presencia de Cd, la transformación MIM3 no mostró variaciones significativas en la acumulación de nmiR3 ni en comparación con la transformación con el vector vacío ni con los niveles obtenidos en ausencia de Cd. Sin embargo, la transformación nmiR3-OE experimentó un incremento muy significativo en la acumulación de nmiR3 por efecto del metal, con 14,40 veces más acumulación de nmiR3 que la transformación con el vector vacío, 24 veces más acumulación de nmiR3 que la transformación MIM3, y 11 veces más que las raíces nmiR3-OE sin tratar con Cd.

El análisis de los genes diana de nmiR3 (Figura 43) mostró que, en ausencia de Cd a los 7 días, los transcritos de *MtGDSL*, *MtPUS* y *MtATPF4* se acumularon en menor cantidad en la transformación MIM 3 (2,38, 2 y 6,25 veces, respectivamente) que en la

transformación con el vector vacío, mientras que los transcritos de *MtGDSL*, *MtPRTF* y *MtATPF4* se acumularon en menor cantidad en la transformación nmiR3-OE (2,63, 2,1 y 10 veces, respectivamente) que en la transformación con el vector vacío. El único gen que mostró una expresión diferencial entre las transformaciones MIM3 y nmiR3-OE a los 7 días en ausencia de Cd fue *MtPRTF* que mostró un contenido de de mRNA en MIM3 2,45 veces superior a la transformación nmiR3-OE.

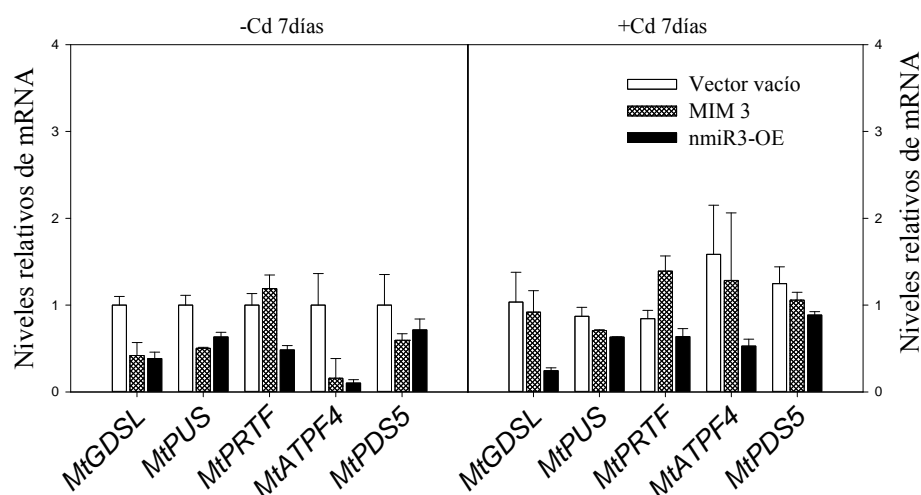


Figura 43. Patrones de expresión de los genes diana de nmiR3 en raíces transformadas de *M. truncatula* cv. Jemalong: con actividad del nmiR3 inhibida (MIM 3), con sobreexpresión del nmiR 3 (nmiR3-OE) o con el vector vacío como control, en 0 ó 75 μ M de CdCl₂, durante 7 días. Las barras indican el error estándar (n =4). *GDSL* esterasa/lipasa (*MtGDSL*); *pseudouridina* sintasa (*MtPUS*); *factor de transcripción relacionado con la patogénesis* (*MtPRTF*); *proteína de unión a iones metálicos* *ATFP4* (*MtATFP4-LP*); *proteína de cohesión de cromátidas* *PDS5* (*MtPDS5-A*).

A los 7 días de tratamiento con Cd, la transformación MIM 3 presentó contenidos similares de mRNA para los transcritos analizados en comparación con el control (vector vacío). Por el contrario, en comparación con la transformación con el vector vacío, nmiR3-OE presentó 4,29 y 2 veces menor contenido de mRNA los transcritos *MtGDSL* y *MtATPF4* respectivamente y no mostró ninguna variación significativa para el resto de genes diana del nmiR3. Sin embargo, cuando comparamos entre las transformaciones MIM3 y nmiR3-OE, pudimos observar como a los 7 días en presencia de Cd, los contenidos de mRNA para *MtGDSL*, *MtPRTF* y *MtATPF4* en la transformación MIM3 fueron 3,8, 2,20 y 2,5 veces superiores a los observados en la transformación nmiR3-OE. Cabe destacar que la exposición a Cd tan sólo promovió un aumento de la expresión de *MtGDSL* en MIM3, que mostró a los 7 días en presencia de Cd 2,16 veces más acumulación de mRNA que a los 7 días en ausencia de Cd, y un

aumento de la expresión de *MtATPF4* tanto en MIM3 como en nmiR3-OE, aunque de mayor magnitud en MIM3, con 8 veces más acumulación de *MtATPF4* en presencia que en ausencia de Cd en la transformación MIM3 y con 4 veces más acumulación de *MtATPF4* en presencia que en ausencia de Cd en la transformación nmiR3-OE.

V. Discusión

V. DISCUSION

1. Identificación de variedades tolerantes a Hg y Cd de *M. truncatula* y potencial uso en fitorremediación

Las leguminosas con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico en simbiosis con rizobios son plantas pioneras en ambientes degradados (Carrasco *et al.*, 2005; Reichman, 2007). Además aquellas que presentan rápido crecimiento y acumulación de biomasa se presentan como prometedoras candidatas para la revegetación de ecosistemas degradados y contaminados (Dary *et al.*, 2010; Arocena *et al.*, 2010; Pajuelo *et al.*, 2011). Una de las principales barreras para aplicar esta fitotecnología es la disponibilidad de cultivares tolerantes a metales pesados. Para ello, es necesaria la identificación de los mismos; y es necesario disponer de métodos de evaluación rápidos y fiables que permitan el análisis de un número elevado de cultivares. En este sentido, uno de los objetivos de este trabajo fue desarrollar un método, que además de las características arriba descritas requiriera poco espacio y generara escasos desechos, para analizar la tolerancia a Hg y a Cd de 258 cultivares procedentes de un banco de germoplasma de *M. truncatula*.

Para evaluar la tolerancia a metales pesados en *Medicago* spp. se han propuesto diferentes métodos (Narasimhamoorthy *et al.*, 2007; Sledge *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007), y son los sistemas de crecimiento hidropónico los que permiten mejor control de la concentración de metal a lo largo de los experimentos (Narasimhamoorthy *et al.*, 2007). Como indicadores de tolerancia a metales se han propuesto parámetros centrados en la actividad fotosintética, el estrés oxidativo o el contenido nutricional (Gómez *et al.*, 2002; Ortega-Villasante *et al.*, 2007; Yadav, 2010), así como parámetros asociados al crecimiento radicular (Prasad, 1995; Peralta *et al.*, 2001; Peralta-Videa *et al.*, 2002, 2004; López *et al.*, 2005; Hakmaoui *et al.*, 2006; Bidar *et al.*, 2007; Esteban *et al.*, 2008). De hecho, la inhibición de la elongación de la raíz es uno de los efectos más rápidos inducidos por la exposición a metales (Sandalio *et al.*, 2001; Schützendübel *et al.*, 2001; Ortega-Villasante *et al.*, 2005; Sledge *et al.*, 2005; Sabreen and Sugiyama, 2008). El sistema hidropónico miniaturizado desarrollado ha permitido el *screening* de plántulas, basado en el último parámetro.

La mayoría de los cultivares de *M. truncatula* analizados fueron sensibles a Hg y Cd; pero, en concordancia con estudios de tolerancia a Al en *M. truncatula* y a Cd en *M. sativa* (Sledge *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011), gracias al elevado número de cultivares analizados y a la variabilidad genética existente en la colección de germoplasma, se

podieron detectar cultivares tolerantes a Cd y/o Hg utilizando el crecimiento relativo de la raíz (RRG) como indicador de la tolerancia a estos metales.

Con el objetivo de encontrar patrones comunes de tolerancia o toxicidad a diferentes metales, los resultados obtenidos en este estudio para Hg y Cd fueron analizados junto con los resultados obtenidos por Sledge *et al.* (2005) para los mismos cultivares en tolerancia a Al. La ausencia de correlación significativa hallada entre Al y Hg o entre Al y Cd podría indicar que los mecanismos de tolerancia a Al son diferentes o no están relacionados con los de Hg y Cd. Sin embargo, la correlación positiva encontrada entre Hg y Cd sugiere que *M. truncatula* podría tener mecanismos de tolerancia a Hg y Cd comunes, al menos en parte, en oposición a lo observado en *M. sativa* donde, en términos de toxicidad o respuesta antioxidante, los mecanismos son aparentemente diferentes (Sobrino-Plata *et al.*, 2009).

La tolerancia y la sensibilidad a los metales pesados pueden variar con el estadio de desarrollo de las plantas (Foy *et al.*, 1978; Peralta-Videa *et al.*, 2004). Para comprobar si el estadio de plántula es adecuado para la identificación de cultivares tolerantes a Hg y/o Cd, se seleccionaron 2 cultivares tolerantes a Hg, 2 tolerantes a Cd, 2 tolerantes a ambos metales y 4 cultivares sensibles a Cd y a Hg, y se crecieron en sobres de crecimiento hidropónico, sistema previamente referenciado en otros estudios de tolerancia a metales pesados y salinidad (Verdoy *et al.*, 2006; Shvaleva *et al.*, 2009; Coba de la Peña *et al.*, 2010). Se determinaron diferentes parámetros relativos con los que se realizó un análisis factorial (método PCA) y se desarrolló un índice de tolerancia para cada metal (nTI). Los cultivares potencialmente tolerantes a Hg obtuvieron una clasificación idéntica a la establecida en el *screening* inicial mediante RRG, confirmándose como tolerantes a Hg. No sucedió lo mismo con los cultivares potencialmente tolerantes a Cd, pero se pudo confirmar a tres de ellos como tolerantes y un cuarto fue en realidad sensible a Cd. En el caso de los cultivares sensibles, la clasificación de tolerancia obtenida para ambos metales no se ajustó de forma idéntica a la obtenida en el *screening*, no obstante todos ellos fueron confirmados como sensibles a los metales.

En diferentes estudios se han utilizado el desarrollo de la raíz y de la parte aérea como indicadores de la tolerancia a Cd o Hg en plantas adultas (Nihei *et al.*, 2005; Dos Santos Utmazian *et al.*, 2007; Shiyab *et al.*, 2009) y se han descrito correlaciones entre desarrollo de la parte aérea y tolerancia a metales (Cd, Cu) en diferentes plantas (Hakmaoui *et al.*, 2006; Sabreen and Sugiyama, 2008). En el presente estudio, se pudo diferenciar claramente dos grupos de cultivares (tolerantes y sensibles) cuando se

representaron los componentes principales uno frente a otro. Además, cuando se consideró cada cultivar como réplica de su categoría de tolerancia, la categoría tolerante en presencia de Hg o de Cd presentó valores significativamente superiores a la categoría sensible para la mayoría de los parámetros estudiados, mostrando que los parámetros relacionados con la producción de biomasa vegetal son más adecuados que el RRG como indicadores de la tolerancia a Hg o a Cd en plantas de 12 días. En cualquier caso, los resultados demostraron que un RRG elevado en presencia de Hg o de Cd en estadio de plántula, en general, es indicador de elevada producción de biomasa en presencia de metales en un estadio de desarrollo más avanzado, validando el método de *screening* rápido de tolerancia a Hg y Cd utilizado. Diferentes estudios han tratado de evaluar la tolerancia de *Medicago* a Al ó Cd, en un único estadio de desarrollo (Sledge *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011; Saeidi *et al.*, 2012; Rahoui *et al.*, 2014), pero en el presente trabajo se evidencia que la tolerancia a metales debe ser evaluada en diferentes estadios de desarrollo para evitar la identificación de falsos tolerantes, y que los resultados de un método de *screening* rápido deben ser posteriormente validados utilizando plantas más desarrolladas. La validación de los resultados en suelos contaminados constituiría la confirmación definitiva de la tolerancia de los cultivares seleccionados y será realizado en un futuro próximo.

El crecimiento de cultivares tolerantes en suelos contaminados podría reducir los efectos de los metales pesados y ayudar en la recuperación de suelos degradados (Tyler *et al.*, 1989; Dary *et al.*, 2010), pero es necesario conocer los patrones de acumulación de estos metales si queremos utilizar los cultivares de la manera más adecuada. Por ello se determinó la acumulación de Hg y de Cd en los cultivares tolerantes y sensibles, encontrándose niveles de metales que no correlacionaban exactamente con la tolerancia, aunque este resultado no era inesperado ya que la tolerancia a metales y la hiperacumulación son rasgos genéticamente independientes (Maestri *et al.*, 2010). En concordancia con otros autores observamos que el Hg y el Cd son acumulados principalmente en las raíces (Sandalio *et al.*, 2001; Paradiso *et al.*, 2008; Sobrino-Plata *et al.*, 2009) y traslocados a la parte aérea en menor cantidad. No obstante, la concentración de Hg en la parte aérea de los cultivares tolerantes fue sistemáticamente menor que en los cultivares sensibles, sugiriendo que los cultivares tolerantes poseen mecanismos para frenar la traslocación del mercurio a la parte aérea. Los cultivares W6 6019 (en Hg y Cd) y W6 5992 (en Hg) presentaron los mayores factores de traslocación y los menores contenidos de metales en raíz, por lo que serían en principio los más

efectivos para estrategias de fitoextracción. Por otro lado, el cultivar W6 6107 para Hg y el cultivar PI 516919 para Cd, presentaron los contenidos más elevados de metal en las raíces y factores de traslocación bajos, pudiendo ser los más útiles para su uso en estrategias de fitoestabilización.

2. Efecto del Cd sobre cultivares de *M. truncatula*

2.1. Efecto del Cd sobre el estado nutricional de cultivares tolerantes y sensibles

El Cd afecta la absorción de nutrientes en la raíz (McCarthy *et al.*, 2001; Benavides *et al.*, 2005; Conn and Gilliam, 2010) probablemente por competición con la absorción y transporte de elementos como Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} (Clemens, 2001; Roth *et al.*, 2006; DalCorso *et al.*, 2008), por lo que el contenido nutricional en presencia y ausencia de Cd fue analizado para los cultivares tolerantes y sensibles a este metal. El análisis global de cultivares tolerantes y sensibles indica que el Cd parece afectar el contenido de más nutrientes en la categoría sensible, sugiriendo mejor balance nutricional en presencia de Cd para los cultivares tolerantes.

El P es vital en procesos importantes para el desarrollo de las plantas, como el transporte de energía y la modulación de la actividad enzimática (Solanki and Dhankhar, 2011). El Cd parece disminuir el contenido de P en las raíces de la categoría sensible, sugiriendo que los cultivares sensibles tendrían afectados los procesos en los que participa este elemento. El S es un macronutriente clave en la síntesis de proteínas y componente estructural de muchas enzimas y compuestos tiólicos importantes para la tolerancia a metales pesados (Ernst *et al.*, 2008; Sarwar *et al.*, 2010), por lo que el aumento de la absorción de S en las raíces tolerantes en presencia de Cd podría indicar un aumento del metabolismo del azufre para hacer frente al estrés por Cd. Así mismo, el Fe, Mn, Cu y Zn son cofactores de enzimas antioxidantes como la APX y las SODs (Lagriffoul *et al.*, 1998; Benavides *et al.*, 2005; Sarwar *et al.*, 2010), aunque elevadas cantidades de estos elementos también inducen estrés oxidativo (Sarwar *et al.*, 2010). En el presente estudio no se observó ninguna variación en el contenido de Fe, Cu y Zn en las raíces, ni en el contenido de Mn en la parte aérea para los cultivares tolerantes, lo que podría traducirse en una mejor defensa antioxidante, en contraste con la disminución del contenido de Mn, Cu y Zn en la parte aérea tratada de los cultivares sensibles.

2.2. Respuesta a Cd en los cultivares tolerante y sensible *CdT* y *CdS*

Para estudiar los mecanismos de tolerancia y toxicidad a Cd en *M. truncatula* se seleccionaron un cultivar tolerante a Cd (PI 516929; *CdT*) y un cultivar sensible (W6

6142; *CdS*), que acumulaban la mayor cantidad de Cd entre todos los cultivares testados y eran morfológicamente similares en ausencia de metal. Además, ambos cultivares mostraron patrones nutricionales de Na y K diferentes en presencia de Cd, que sugieren una relación K/Na mayor en *CdT* que en *CdS*, y por tanto un balance iónico más favorable en el cultivar tolerante. Se estudió el efecto del Cd sobre diferentes estadios de desarrollo y diferentes parámetros indicadores del estado fisiológico, la capacidad antioxidante y el daño oxidativo.

La germinación puede ser muy sensible en comparación con otros estadios de desarrollo y se sabe que el Cd afecta negativamente a este proceso (Rahoui *et al.*, 2008; Kuriakose and Prasad, 2008). La actividad de las amilasas, que hidrolizan las reservas de almidón en las semillas movilizándolas hacia los ejes embrionarios durante la germinación, es afectada por la exposición a Cd (Bishnoi *et al.*, 1993; Kuriakose and Prasad, 2008), restringiendo la movilización de reservas y alterando el desarrollo de las plantas (Ernst, 1998; Rahoui *et al.*, 2008, 2010). En nuestro caso, el Cd tan solo afectó negativamente la germinación de *CdS*; sin embargo, el metal inhibió la hidrólisis de almidón en ambos cultivares *CdS* y *CdT*, aunque en *CdS* (64%) fue notablemente superior a la observada en *CdT* (26%). Este hecho unido al mejor porcentaje de germinación indicaría una movilización de reservas menos afectada y un mejor desarrollo en *CdT* durante la exposición a Cd, en concordancia con otros autores que describen diferencias en la germinación durante la exposición a Cd en función del grado de tolerancia para diferentes cultivares de *M. truncatula* (Rahoui *et al.*, 2014).

El Cd afecta a multitud de procesos metabólicos en las plantas y aunque no participa en la reacción de Fenton (Mithöfer *et al.*, 2004) genera ROS, interfiriendo la expresión génica e induciendo las defensas antioxidantes (Gratão *et al.*, 2005; Chaoui and El Ferjani, 2005; Paradiso *et al.*, 2008; Sobrino-Plata *et al.*, 2009; Cuyppers *et al.*, 2010; Marino *et al.*, 2013; Pérez-Chaca *et al.*, 2014; Rahoui *et al.*, 2014), vitales para evitar los efectos negativos del estrés y el daño oxidativo (Suzuki *et al.*, 2012; Considine and Foyer, 2014). Estas defensas comprenden enzimas antioxidantes como las SODs, CAT, enzimas del ciclo ASC-GSH (Sandalio *et al.*, 2001; Schützendübel *et al.*, 2002; Romero-Puertas *et al.*, 2007) y enzimas generadoras de poder reductor (NADPH), (Izawa *et al.*, 1998; Debnam *et al.*, 2004; Noctor, 2006; Marino *et al.*, 2007; Foyer and Noctor, 2009; Pérez-Chaca *et al.*, 2014), esenciales para el mantenimiento de la defensa antioxidante y el estado reducido de los metabolitos antioxidantes GSH y ASC (Noctor and Foyer, 1998; Kular *et al.*, 2004; Sobrino-Plata *et al.*, 2014b, 2014a). Cuando la

producción de ROS supera a las defensas antioxidantes se produce un estallido oxidativo que provoca daños severos, como la peroxidación de lípidos y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática entre otros (McCarthy *et al.*, 2001; Schützendübel and Polle, 2002; Polle and Schützendübel, 2003); controlar estos daños es un factor determinante en la tolerancia de las plantas a los metales pesados (Demidchik *et al.*, 1997).

Los resultados del estudio en plántulas tratadas durante 12 h, mostraron patrones de expresión diferenciales dependiendo de la categoría de tolerancia a Cd, incluso en ausencia de metal, donde el cultivar *CdS* mostró niveles de expresión superiores a *CdT* para muchas de las principales enzimas antioxidantes. Por otro lado, en presencia de Cd el cultivar *CdT* mostró un gran aumento de la expresión de *MtCAT*, junto con *MtγECS*, *MtMR*, *MtG6PDH*, *Mt6PGDH* e *MtICDH* y tan solo se observó represión para *MtG6PDH*. Esto sugiere que el fuerte aumento de CAT mantiene los niveles de H₂O₂ bajos, evitando el estallido oxidativo. Inducciones de CAT en presencia de Cd han sido descritas en plantas de guisante (Romero-Puertas *et al.*, 2007; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2009) y plantas transgénicas que sobreexpresan CAT muestran menor toxicidad por Cd gracias al mantenimiento de un nivel basal de H₂O₂ (Guan *et al.*, 2009). Además, el aumento en la expresión de las enzimas productoras de NADPH en *CdT* implicaría el mantenimiento de las reacciones del ciclo ASC-GSH y el estado reducido de los antioxidantes no enzimáticos. Se ha descrito que la soja responde al estrés oxidativo impuesto por Cd induciendo las enzimas responsables del reciclaje y generación de NADPH para mantener la efectividad del ciclo ASC-GSH (Noctor, 2006; Pérez-Chaca *et al.*, 2014) y la tolerancia a Cd en diferentes cultivares de pimiento era más dependiente de la disponibilidad de NADPH y la actividad ICDH que de su capacidad antioxidante (León *et al.*, 2002). Aparentemente, los genes de biosíntesis de glutatión y fitoquelatinas no aumentaron significativamente su expresión en *CdT*, y sí aumentó la expresión de *MtMR*. En *M. sativa* expuesta a Cd tratada con BSO (buthionina sulfoximina), que es un inhibidor de la síntesis de glutatión, no se produce un incremento de estrés oxidativo, por lo que se concluyó que otros metabolitos (ASC) eran responsables de mantener la homeostasis (Sobrinho-Plata *et al.*, 2014b). Se ha descrito que la hipertolerancia a Cd no depende de las fitoquelatinas puesto que el BSO solo incrementó la sensibilidad a Cd en plantas susceptibles (Schat *et al.*, 2002). En concordancia con lo descrito, el cultivar *CdT*, a pesar de mostrar una reducción del contenido de GSH y GSSG, incrementó significativamente su relación GSH/GSSG en

presencia de Cd, sugiriendo un buen balance antioxidante. Además, el menor daño oxidativo observado mediante las tinciones histoquímicas, indicadoras de peroxidación de lípidos y pérdida de la integridad de la membrana plasmática, demuestra que la estrategia adoptada por el cultivar *CdT* es exitosa, mejorando la defensa antioxidante mediante la sobreexpresión de CAT y producción de NADPH, lo que puede permitir contrarrestar la sobreproducción de ROS y evitar la explosión y daño oxidativos, confiriendo tolerancia a Cd. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos para ésta y otras especies, donde la menor acumulación de H₂O₂ gracias a la defensa antioxidante evita daños oxidativos severos y promueve mejor crecimiento de la raíz en presencia de Cd en plántulas tolerantes (Cho and Seo, 2005; Rahoui *et al.*, 2014).

En presencia de Cd, el cultivar *CdS* mostró represión de *MtCuZnSODa*, *MtCuZnSODc* y *MtGalLDH* e inducciones para *MtCYS*, *MtγECS*, *MtGSHG*, *MtGR* y *MtGalLDH*, sugiriendo que este cultivar podría sufrir una acumulación de H₂O₂ debido a la represión de las SODs en presencia de Cd, desencadenando una explosión oxidativa con serios efectos deletéreos. Aunque se han descrito respuestas diversas de SODs a Cd en diferentes leguminosas (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006; Romero-Puertas *et al.*, 2007; Pérez-Chaca *et al.*, 2014), recientemente se ha demostrado en cultivares de *M. truncatula* muy sensibles a Cd la represión de genes SODs por la exposición a este metal (Rahoui *et al.*, 2014). El aumento de expresión de los genes responsables de la biosíntesis de glutatión en *CdS* podría ser consecuencia de la explosión oxidativa, en un intento por controlar el daño oxidativo impuesto por el metal, en concordancia con otros autores (Romero-Puertas *et al.*, 2007; Smeets *et al.*, 2008; Ogawa *et al.*, 2009; Pérez-Chaca *et al.*, 2014). Además, la represión de *MtGalLDH*, sugiere una menor producción de ASC para hacer frente al daño oxidativo. Observaciones en trigo sometido a Cd demuestran que la inducción de *GalLDH* ayuda a limitar el daño y la toxicidad del metal (Zhao *et al.*, 2005; Paradiso *et al.*, 2008). Por otro lado, *CdS* no mostró variación de la relación GSH/GSSG en presencia de Cd, quizá gracias al aumento de expresión de los genes relacionados con su biosíntesis, en concordancia con observaciones en *M. sativa* expuesta a Cd (Sobrino-Plata *et al.*, 2009). Sin embargo, el daño oxidativo observado en las raíces, mediante las tinciones histoquímicas, demuestra que la explosión oxidativa supera las defensas antioxidantes en *CdS*, manifestando sensibilidad a Cd. Globalmente, estos resultados concuerdan con la relación observada entre absorción de Cd, inhibición del crecimiento de la raíz y daño oxidativo en genotipos de *M. truncatula* sensibles a Cd (Rahoui *et al.*, 2014).

Como se ha dicho anteriormente, la tolerancia de las plantas depende del estadio de desarrollo. Con objeto de determinar el comportamiento de *CdT* y *CdS* en estadios de desarrollo posteriores al de plántula, se estudió el efecto del Cd sobre la actividad total de las dos enzimas antioxidantes cruciales en estas plantas, SOD y CAT, además de la peroxidación de lípidos como marcador de daño oxidativo, en plantas expuestas a Cd durante 15 días.

Es frecuente encontrar variaciones en la actividad de enzimas antioxidantes para diferentes especies de plantas en presencia de Cd (Schützendübel and Polle, 2002; Verma and Dubey, 2003; Zhang *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008b; Dazy *et al.*, 2009). En cualquier caso, la capacidad antioxidante de las plantas para combatir el daño oxidativo producido por el Cd es limitada (Chaoui and El Ferjani, 2005; Paradiso *et al.*, 2008), siendo la acumulación de H₂O₂ particularmente dañina y clave en la reducción del crecimiento (Schützendübel *et al.*, 2002). No hay duda de que el Cd causa estrés oxidativo en las plantas y la peroxidación de lípidos es un evento común durante la exposición a este metal (Gallego *et al.*, 2012), habiéndose observado en tomate (Dong *et al.*, 2006; Smeets *et al.*, 2009), *A. thaliana* (Smeets *et al.*, 2009) y también en leguminosas como guisante (Chaoui and El Ferjani, 2005), *M. sativa* (Cui *et al.*, 2013) y *M. truncatula* (Xu *et al.*, 2009). Nuestros resultados mostraron que el Cd no produjo efectos significativos sobre la actividad SOD y CAT en las raíces del cultivar *CdT*, indicando que aparentemente no estaban siendo afectadas por el metal, pero se observó un significativo incremento de la actividad CAT en su parte aérea, atribuible al incremento de ROS habitual provocado por la actividad fotosintética (Foyer *et al.*, 1994; Mittler, 2002). En contraste, el Cd promovió en el cultivar *CdS* un fuerte aumento de la actividad SOD en ambos órganos, además de un fuerte incremento de la actividad CAT en las raíces tratadas, sugiriendo que este cultivar estaba sometido a un fuerte estrés oxidativo. Por otro lado, el Cd disminuyó la actividad CAT en la parte aérea de *CdS*, probablemente debido a una regulación postranscripcional y/o traduccional de esta enzima en presencia del metal como se ha sugerido para otras plantas (León *et al.*, 2002; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006, 2009; Romero-Puertas *et al.*, 2007). Sin embargo, el Cd causó peroxidación de lípidos en las raíces de ambos cultivares, mientras que solo causó un incremento de la peroxidación de lípidos en la parte aérea del cultivar *CdS*, que además, incluso en ausencia de Cd mostraba mayores niveles de peroxidación de lípidos que *CdT* en la parte aérea. Estos resultados, en concordancia con el resto del trabajo, sugieren que *CdT* posee una defensa antioxidante capaz de evitar mejor el daño

oxidativo durante la exposición a Cd también en estadios de desarrollo más maduros, mientras que la respuesta antioxidante del cultivar *CdS* no es suficiente y se ve sobrepasada por la acumulación de ROS.

En conjunto, parece que los cultivares *CdT* y *CdS* responden al estrés oxidativo producido por el Cd mediante diferentes estrategias, siendo la estrategia del cultivar tolerante obviamente la más exitosa. Se ha descrito que SOD/CAT y el ciclo ASC-GSH son dos mecanismos complementarios del control del estrés oxidativo, constituyendo el sistema denominado “defensa doble” (Foyer *et al.*, 1994; Prasad, 1998; Mittler, 2002). El presente trabajo, aunque limitado a un cultivar tolerante y otro sensible, sugiere que este concepto puede ser valioso en la evaluación e identificación de tolerancia a metales, ya que las enzimas SOD y CAT parecen fundamentales para evitar la explosión oxidativa en el cultivar tolerante a Cd, manteniendo un nivel basal de ROS, y confiriendo tolerancia a este metal. En la planta no tolerante, cuando este mecanismo se ve superado por la acumulación de ROS se activaría el ciclo ASC-GSH como un mecanismo adicional que puede controlar el daño oxidativo o no, dependiendo de la magnitud del estrés. El análisis de otros cultivares identificados como sensibles o tolerantes permitiría la verificación de esta hipótesis.

3. Papel de la prolina en la tolerancia a Cd: Respuesta a Cd de la línea transgénica de *M. truncatula* p18

La prolina es una molécula osmoprotectora sintetizada en plantas en respuesta a diferentes estreses abióticos (Delauney and Verma, 1993; Schat *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2000; Ashraf and Foolad, 2007) y también en respuesta a metales pesados (Bassi and Sharma, 1993; Prasad and Saradhi, 1995; Schat *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001; Siripornadulsil *et al.*, 2002; Bačkor *et al.*, 2004; Choudhary *et al.*, 2007) con diversas funciones entre las que destaca la captación de ROS y la regulación del potencial redox celular (Handa *et al.*, 1986; Smirnoff and Cumbes, 1989; Maggio *et al.*, 2002; Kishor *et al.*, 2005; Ashraf and Foolad, 2007; Szabados and Saviouré, 2009). Una línea transgénica de *M. truncatula* que sobreexpresa el gen Δ^1 -pyrrolina-5-carboxylato sintetasa (*P5CS*) de *Vigna aconitifolia* que acumula prolina y muestra tolerancia a estrés por sal (Verdoy *et al.*, 2006), fue utilizada junto con su fondo genético, *M. truncatula* (Gaertn.) R-108-1 (c3) como WT, para estudiar el papel de la prolina en la tolerancia al Cd, evaluándose diferentes estadios de desarrollo y parámetros indicadores del estado fisiológico, la capacidad antioxidante y el daño oxidativo.

Los resultados demostraron que la sobreexpresión de *VaP5CS* en *M. truncatula* no solo favorece notablemente su germinación en presencia de Cd, sino que incrementa el nivel de tolerancia a Cd de las plántulas, evaluado mediante RRG como indicador de tolerancia en sistema hidropónico miniaturizado. Por ello se puede concluir que durante los primeros estadios de desarrollo, la línea transgénica p18 mostró una mayor tolerancia al Cd que el WT, en concordancia con otros estudios donde plantas que sobreexpresan genes P5CS han manifestado un aumento de la tolerancia a sal (Kishor *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1998; Sawahel and Hassan, 2002; Han and Hwang, 2003) y microalgas transgénicas que sobreexpresan genes P5CS han manifestado un aumento de la tolerancia a Cd (Siripornadulsil *et al.*, 2002).

La acumulación de prolina en plantas se produce fundamentalmente *de novo* por acción de la enzima P5CS (Delauney and Verma, 1993; Hong *et al.*, 2000) que juega un importante papel en la regulación del contenido de prolina a nivel génico, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés (Kishor *et al.*, 2005). La prolina además de captar, detoxificar y estabilizar el contenido de ROS, puede activar rutas de detoxificación alternativas, como la respuesta antioxidante y la síntesis de fitoquelatinas (Siripornadulsil *et al.*, 2002; Choudhary *et al.*, 2007; Szabados and Saviouré, 2009). La biosíntesis de prolina requiere NADPH para las reacciones de reducción de glutamato a prolina (Hayashi *et al.*, 2000; Ábrahám *et al.*, 2003; Choudhary *et al.*, 2007; Szabados and Saviouré, 2009), por lo que las enzimas suministradoras de NADPH son importantes para la producción de este osmolito. Por otro lado, el catabolismo de la prolina también es necesario para la generación de NADPH, influenciando numerosas rutas metabólicas adicionales (Verbruggen and Hermans, 2008).

Nuestros resultados mostraron que en ausencia de Cd, las raíces de la línea transgénica p18 posee mayores niveles de expresión que el WT para la mayoría de los genes relacionados con el metabolismo de la prolina, para los genes *MtFeSOD*, *MtMnSOD* y *MtCAT*, para todos los genes estudiados relacionados con el metabolismo de azufre, el ciclo ASC-GSH, la biosíntesis de fitoquelatinas y las enzimas suministradoras de NADPH. Por el contrario, en la parte aérea en ausencia de Cd, la mayoría de los genes del metabolismo de prolina y los transcritos *MtFeSOD*, *MtCAT*, *MthGSHG* y *MtPCS* mostraron mayores niveles de expresión en el WT y tan solo *MtCuZnSODa* mostró mayores niveles de expresión en p18. Estos resultados sugieren que la expresión de *VaP5CS* en *M. truncatula* activa el metabolismo de la prolina y mejora la respuesta antioxidante, la síntesis de fitoquelatinas y los niveles de NADPH,

al menos en las raíces. Esta respuesta no sistémica, centrada en el fortalecimiento de la defensa de las raíces, tiene sentido si tenemos en cuenta que este órgano es el que sustenta el resto de la planta a través de la absorción de agua y nutrientes y la parte de la planta habitualmente más expuesta a las agresiones ambientales que provocan estrés, sugiriendo que la línea transgénica p18 está mejor preparada para soportar el estrés por Cd. Además, el mayor contenido de transcrito de *ProT* en la línea p18 podría indicar un transporte activo de prolina a la parte aérea superior al existente en el WT.

En presencia de Cd, las raíces de la línea transgénica p18 mostraron una fortísima acumulación del transgen *VaP5CS*, acompañada de un aumento en la expresión de *MtProDH*, *MtP5CDH*, *MtFeSOD* y *MtGSHS* y aunque el tratamiento no varió los niveles de expresión de *MtCAT*, estos eran muy elevados. Sin embargo, las expresiones de *MtP5CS1*, *MtCuZnSODa*, *MtCYS*, *MthGSHS*, *MtGPX*, *MtMR* y *MtG6PGDH* disminuyeron en presencia de Cd. Por otro lado, en la parte aérea de la línea p18 el Cd disminuyó la expresión del transgen *VaP5CS*, junto con *MtP5CS2*, *MtP5CDH*, *MtOAT*, *ProT*, *MtG6PDH* y *MtICDH* y promovió un aumento en la expresión de *MtProDH*, *MtCuZnSODa* y *MtGalLDH*. En el caso del WT, en las raíces tratadas aumentó la expresión de *MtProDH*, *MtP5CDH*, *MtFeSOD*, *MtGR*, *MtG6PDH*, *MtICDH* y todos los genes de la biosíntesis de glutatión y fitoquelatinas, menos *MthGSHS* que disminuyó su expresión y *MtGPX* que no mostró variación. También fueron afectados negativamente *MtOAT*, *MtCuZnSODa* y *MtCAT*. En la parte aérea del WT el Cd promovió un aumento de la expresión de *MtP5CS2*, que ha sido descrita como específica de parte aérea (Armengaud *et al.*, 2004), *P5CDH*, *ProT*, *MtCuZnSODb*, *MtCuZnSODa*, *MtCAT*, *MtCYS*, *MtgECS*, *MtGSHS*, *MtGR* y *MtG6PDH*, mientras que el Cd promovió la disminución de la expresión de *MtProDH*, *MtOAT* y *MtGalLDH*.

Algunos estudios han mostrado cómo la acumulación de prolina en diferentes especies en respuesta a sal, Cd u otros metales produjo aumento de las actividades CAT y/o SOD (Choudhary *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2009) y del contenido de GSH (Paleg *et al.*, 1984; Hoque *et al.*, 2008). La sobreexpresión del gen *P5CS* en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* aumentó la acumulación de prolina y promovió la tolerancia y acumulación de Cd mediante la biosíntesis de glutatión y fitoquelatinas (Siripornadulsil *et al.*, 2002). La primera enzima que participa en el catabolismo de prolina es ProDH seguida de P5CDH, generándose NADPH. Diferentes estudios indican que la prolina puede constituir una fuente de NADPH de fácil acceso (Verbruggen and Hermans, 2008) sugiriendo que su catabolismo es importante para el

mantenimiento de GSH y ASC durante condiciones de estrés (Kishor *et al.*, 2005). Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de *VaP5CS* en las raíces de p18 mejora su defensa antioxidante vía CuZnSOD, CAT y producción de GSH y fitoquelatinas a través del aumento en la expresión de *MtGSHS* y la no inhibición de *MtPCS*, manteniendo el control de los niveles de ROS y el secuestro del Cd. La catálisis de la prolina acumulada en exceso en p18 permitiría la obtención de NADPH para el mantenimiento del estado reducido del glutatión y otros metabolitos. El resto de disminuciones en la expresión génica podrían representar eventos de autorregulación que responderían a elevados niveles de antioxidantes y NADPH. El control del estrés por Cd en las raíces de p18 permitiría que en la parte aérea se mantenga la síntesis de glutatión y fitoquelatinas constante e incluso se indujera la síntesis de ASC a través de *MtGalLDH*. Por el contrario, en el WT el Cd afecta negativamente a la SOD y la CAT, causando un estallido oxidativo e induciendo fuertemente la biosíntesis de glutatión y fitoquelatinas. Para hacer frente a los elevados requerimientos de NADPH, el WT se vería forzado a inducir la catálisis de la prolina. Sin embargo, la explosión oxidativa probablemente no es controlada, afectando a la parte aérea donde se induce la defensa antioxidante, la acumulación de prolina y la producción de NADPH. En contraposición a lo descrito por otros autores en condiciones de estrés salino (Armengaud *et al.*, 2004; Verdoy *et al.*, 2006), la represión parcial observada para *MtOAT* en ambas líneas sugiere que la ornitina no juega un papel importante en la síntesis de prolina durante la exposición a Cd, siendo el glutamato la principal fuente para su biosíntesis (Delauney and Verma, 1993; Delauney *et al.*, 1993).

También se estudió el efecto del Cd en plantas de la línea p18 y el WT expuestas a diferentes concentraciones de Cd durante 32 días y de nuevo se observó cómo la expresión de *VaP5CS* en *M. truncatula* reducía los efectos negativos del Cd, mejorando notablemente la supervivencia de la línea p18, que mostraba valores significativamente superiores para todos los parámetros morfológicos y un mayor contenido relativo de clorofilas que el WT. Estos resultados apuntan a que la prolina, además de mejorar la tolerancia a Cd, protege los fotosistemas de los efectos negativos producidos por la acumulación de ROS, como se ha sugerido previamente (Prasad and Saradhi, 1995; Saradhi and Mohanty, 1997; Szabados and Savouré, 2009). Cabe destacar que el Cd afectó negativamente al contenido de P en raíces y parte aérea del WT, y de Zn y Cu en las raíces del WT pero no en la línea p18. Estos resultados concuerdan con las observaciones anteriores donde el Cd disminuía el contenido de P, Zn y Cu en los

cultivares sensibles a Cd, pero no en los cultivares tolerantes, lo que tal vez podría traducirse en una disminución de la actividad de las CuZnSODs por falta de sus cofactores e indirectamente mayor acumulación de ROS en las plantas sensibles. La línea p18 también mostró mayores niveles de acumulación de Cd que el WT en ambos órganos, aunque el porcentaje de traslocación de Cd a la parte aérea fue menor, sugiriendo que la expresión de *VaP5CS* y la consiguiente acumulación de prolina tiene un efecto sobre los mecanismos de la traslocación de Cd a la parte aérea.

En las raíces de la línea p18, la expresión de *VaP5CS* aumentó los niveles de GSSG y GSH en presencia de Cd, aunque no promovió un incremento de la relación GSH/GSSG. Estos resultados podrían indicar que gran parte del GSH fue destinado a la síntesis de fitoquelatinas, como se ha descrito en otros estudios (Siripornadulsil *et al.*, 2002). El contenido de prolina fue notablemente superior en la línea p18 al del WT, tanto en presencia como en ausencia de Cd, aunque el Cd no influyó en este parámetro. La expresión de *VaP5CS* también benefició a la actividad CAT en la línea p18, que no fueron afectadas por el Cd o incrementaron su actividad, mientras que las raíces del WT mostraron un descenso de la actividad CAT y una ligera represión de la actividad SOD en presencia del Cd. Se ha descrito que la acumulación de prolina en respuesta a sal y metales pesados, además de inducir la actividad CAT y SOD e incrementar el GSH, reduce la peroxidación de lípidos en diferentes plantas y algas (Paleg *et al.*, 1984; Mehta and Gaur, 1999; Matysik *et al.*, 2002; Khedr *et al.*, 2003; Hoque *et al.*, 2008; Krishnan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2009; Rascio and Navari-Izzo, 2011). En nuestro caso, ambas líneas mostraron un incremento de la peroxidación de lípidos en presencia de Cd, aunque la magnitud del daño oxidativo siempre fue menor en la línea p18.

En general los resultados demuestran que la acumulación de prolina favorece la defensa antioxidante y la síntesis de glutatión y fitoquelatinas, confiriendo tolerancia al Cd en la línea p18.

4. MicroRNAs en respuesta a Cd en *M. truncatula*

Los miRNAs son una de las clases más abundantes de npcRNAs en plantas, participan en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional y traduccional (Vaucheret, 2006; Mallory and Vaucheret, 2006; Guleria *et al.*, 2011; Bustos-Sanmamed *et al.*, 2013) y se ha descrito su implicación en procesos esenciales para la regulación del desarrollo y la respuesta a estreses (Sunkar *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2007; Chen, 2009; Jones-Rhoades, 2012; Kruszka *et al.*, 2012), incluyendo metales

pesados (Becher *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2004; Herbette *et al.*, 2006). Por ejemplo, en *Brassica napus* y *M. truncatula*, se ha encontrado que miR393 y miR171 están implicados en la respuesta a metales pesados (Zhou *et al.*, 2008a; Huang *et al.*, 2010) y miR397, miR408 y miR398 se inducen en presencia de Cd en raíces de arroz y *B. napus* (Ding *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012a). Para entender mejor la función de estos miRNAs, además de describirlos es necesario estudiar sus interacciones/funciones en diferentes especies y cultivares de plantas, pues aunque algunos miRNAs parecen estar conservados en plantas, otros parecen depender de la especie vegetal y del propio metal (Yang and Chen, 2013).

Recientemente se han identificado microRNAs en ápices de raíz de *M. truncatula* sometidas a estreses bióticos y abióticos (Formey *et al.*, 2014). Siete de estos microRNAs fueron analizados comparativamente en raíces de un cultivar tolerante a Cd (*CdT*) y un cultivar sensible (*CdS*) con el objetivo de estudiar su posible papel en la tolerancia al Cd. En presencia de Cd tres de ellos (nmiR1, 3 y 6) aumentaron su expresión en *CdS*, y disminuyó o se mantuvo constante en *CdT*, sugiriendo que el aumento de expresión de estos miRNAs es en parte responsable de la diferente sensibilidad a Cd mostrada por *CdS* y *CdT*. Se ha descrito que dos cultivares de soja, uno tolerante a Cd y otro sensible, mostraron expresión diferencial para 26 miRNAs en respuesta a Cd que podrían explicar las diferencias en el grado de tolerancia (Fang *et al.*, 2013).

Atendiendo a los genes diana de los miRNAs de *M. truncatula* (Formey *et al.*, 2014) nmiR3, perteneciente a la familia MIR1509, fue seleccionado por regular negativamente genes de interés para el estrés por metales, concretamente una pseudouridina sintasa (*MtPUS*), importante para la traducción y acumulación de proteínas (Yu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010) responsable de la síntesis de pseudouridina, una proteína de unión a iones metálicos (*MtATFP4*) perteneciente a una superfamilia de proteínas transportadoras y detoxificadoras de metales pesados, una proteína de cohesión de cromátidas hermanas (*MtPDS5-A*), importante para el correcto desarrollo de la mitosis, un factor de transcripción relacionado con la patogénesis (*MtPRTF*) y una GDGL esterasa/lipasa (*MtGDGL*) que puede hidrolizar residuos de cisteína (Akoh *et al.*, 2004).

Para validar la interacción entre nmiR3 y sus genes diana, los patrones de expresión de estos genes fueron analizados en las mismas plantas y bajo las mismas condiciones que nmiR3, observándose niveles de expresión muy superiores para todos los genes tanto en ausencia como presencia de Cd en el cultivar *CdT* en comparación con *CdS*.

Los transcritos *MtPUS* y *MtPRTF* no variaron significativamente durante la exposición a Cd en *CdT*, mientras que *MtGDSL*, *MtATFP4* y *MtPDS5* mostraron un aumento de su expresión. Esto sugiere que el Cd afecta negativamente al cultivar *CdS* promoviendo la acumulación de nmiR3, que inhibe la expresión de los genes diana, afectando a los procesos en los que participan estos genes. Diferentes miRNAs de la familia MIR 1509, a la que pertenece nmiR3, han sido descritos con anterioridad, en respuesta a Hg en *M. truncatula* (Zhou *et al.*, 2012b) y en respuesta a un exceso de Mn en *Phaseolus vulgaris* (Valdés-López *et al.*, 2010), pero tan solo un estudio describe un miRNA de esta familia en respuesta a Cd en dos cultivares de soja (uno tolerante a Cd y otro sensible), analizándose su interacción con uno de los genes que regulaba sin encontrar grandes diferencias entre los cultivares (Fang *et al.*, 2013).

La mayoría de los trabajos que describen miRNAs en respuesta a metales hasta la fecha se centran en la identificación de los mismos y de sus genes diana (Zhou *et al.*, 2008b; Huang *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012a) siendo aún escasos los estudios funcionales en la respuesta al estrés por metales. Para caracterizar la función de nmiR3 en respuesta a Cd, se generaron raíces transformadas de *M. truncatula*, en las que se inhibió la expresión de nmiR3 (MIM3) o se sobreexpresó este miRNA (nmiR3-OE). Los resultados demostraron que la inhibición de nmiR3 disminuía el efecto adverso del Cd, puesto que el metal no afectó el desarrollo de las raíces transformadas con la construcción MIM3, pero sí restringía el crecimiento en las raíces que sobreexpresaban el nmiR3 (nmiR3-OE). Se observó correlación entre la acumulación de nmiR3 y la represión de los genes diana en nmiR3-OE, apuntando a un papel relevante en la toxicidad del Cd. Este trabajo constituye una primera aproximación y son necesarios estudios adicionales para corroborar nuestras observaciones, por ejemplo evaluando el efecto del Cd en raíces transformadas de *M. truncatula* sobreexpresando y reprimiendo los diferentes genes diana de nmiR3, y estudiando la localización y las condiciones de expresión de su promotor, etc.

VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1. El método de *screening* desarrollado, mediante un sistema hidropónico miniaturizado utilizando el crecimiento relativo de la raíz (RRG) como indicador de la tolerancia en plántulas, es eficaz y adecuado para identificar cultivares de *M. truncatula* sensibles a Hg y/o Cd y cultivares potencialmente tolerantes a estos metales, permitiendo evaluar de manera muy rápida y barata un amplio número de cultivares.
2. El RRG en plántulas constituye un parámetro adecuado para predecir la tolerancia a Hg y Cd. Sin embargo, los parámetros relacionados con la producción de biomasa son mejores indicadores de la tolerancia en estadios de desarrollo posteriores y permite excluir falsos tolerantes.
3. W6 6019, que es el cultivar más tolerante a ambos metales, y W6 5992, cultivar tolerante a Hg, podrían resultar útiles para su uso en técnicas de fitoextracción, puesto que son los cultivares tolerantes con mayor capacidad de traslocación a la parte aérea. PI 516929 es el cultivar tolerante a Cd con mayor acumulación en las raíces y con una muy baja traslocación a la parte aérea, siendo el más adecuado para su uso en técnicas de fitoestabilización.
4. Se ha identificado y caracterizado un cultivar tolerante a Cd (PI 516929; *CdT*) y otro sensible (W6 6142; *CdS*) en términos de crecimiento, defensa antioxidante y daño oxidativo. Los cultivares tolerante y sensible estudiados muestran estrategias diferentes de respuesta a Cd. Mientras que el cultivar tolerante sometido a Cd posee una defensa antioxidante mejorada por la alta expresión de CAT y la producción de NADPH, contrarrestando la sobreproducción de ROS y evitando la explosión y daño oxidativo, el cultivar sensible no puede controlar la acumulación de ROS, en parte como consecuencia de la represión de SOD, produciéndose una explosión oxidativa que induce la defensa antioxidante y la biosíntesis de fitoquelatinas en un intento por resistir el daño oxidativo impuesto por el Cd, mecanismo que no resulta suficiente en las condiciones de estrés ensayadas.
5. Las enzimas SOD y CAT pueden ser fundamentales para mantener el equilibrio redox durante la exposición a Cd en cultivares tolerantes y podrían constituir marcadores de tolerancia a Cd, mientras que el ciclo ASC-GSH parece constituir un mecanismo de respuesta secundario, al menos en los cultivares analizados.
6. La expresión de *VaP5CS* en *M. truncatula* y la consecuente acumulación de prolina mejora notablemente la germinación, el estado fisiológico de las plantas, la defensa

antioxidante y la síntesis de fitoquelatinas y previene el daño oxidativo en presencia de Cd. Además la prolina puede constituir una fuente importante de NADPH durante el estrés por Cd. La línea transgénica p18 puede considerarse candidata para el desarrollo de tecnologías de fitorremediación.

7. Los miRNAs 1, 3 y 6 parecen estar relacionados con la sensibilidad al Cd mostrada por el cultivar sensible W6 6142 (*CdS*): en presencia del metal estos miRNAs se inducen en este cultivar pero no en el cultivar tolerante PI 516929.

8. La sobreexpresión de nmiR3 en raíces transgénicas de *M. truncatula* limita el desarrollo de las raíces en presencia de Cd, posiblemente debido a la regulación negativa de genes implicados en el desarrollo y la respuesta a metales.

VII. Bibliografia

VII. BIBLIOGRAFIA

- Ábrahám E, Rigó G, Székely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L. (2003). Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **51**, 363–372.
- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126.
- Akoh C, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, Shaw JF. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* **43**, 534–552.
- Aloui A, Recorbet G, Gollotte A, Robert F, Valot B, Gianinazzi-Pearson V, Aschi-Smiti S, Dumas-Gaudot E. (2009). On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: A root proteomic study. *Proteomics* **9**, 420–433.
- Armengaud P, Thierry L, Buhot N, Grenier de March G, Savouré A. (2004). Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiol. Plant.* **120**, 442–450.
- Arocena JM, Van Mourik JM, Schilder M, Faz A. (2010). Initial soil development under pioneer plant species in metal mine waste deposits. *Restor. Ecol.* **18**, 244–252.
- Ashraf M, Foolad MR. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* **59**, 206–216.
- ASTDR. (1999). Draft Toxicological Profile for Mercury (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>).
- ATSDR. (2008). Draft Toxicological Profile for Cadmium (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>).
- Azadpour A, Matthews J. (1996). Remediation of metal-contaminated sites using plants. *Remediation* **6**, 1–18.
- Bačkor M, Fahselt D, Wu CT. (2004). Free proline content is positively correlated with copper tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *Plant Sci.* **167**, 151–157.
- Barceló J, Poschenrieder C. (1990). Plant water relations as affected by heavy-metal stress- A review. *J. Plant Nutr.* **13**, 1–37.
- Barker D, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad S, Huguet T. (1990). *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **8**, 40–49.
- Bassi R, Sharma SS. (1993). Proline accumulation in wheat seedlings exposed to zinc and copper. *Phytochemistry* **33**, 1339–1342.
- Bates L. (1973). Rapid determination of free proline for water - stress studies. *Plant Soil* **39**, 205–207.
- Becana M, Matamoros MA, Udvardi M, Alton DA. (2010). Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytol.* **188**, 960–976.
- Becher M, Talke IN, Krall L, Krämer U. (2004). Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J.* **37**, 251–268.
- Benavides M, Gallego SM, Tormaro M. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* **17**, 21–34.
- Bidar G, Garçon G, Pruvot C, Dewaele D, Cazier F, Douay F, Shirali P. (2007). Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environ. Pollut.* **147**, 546–53.

- Bishnoi N, Sheroran I, Singh R.** (1993). Effect of cadmium and nickel on mobilization of food reserves and activities of hydrolitic enzymes in germinating pigeon pea seeds. *Biol.Plant* **35**, 583–589.
- Boisson-dernier A, Chabaud M, Rosenberg C, Barker DG.** (2001). *Agrobacterium rhizogenes* -based transformation of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact* **14**, 695–700.
- Bowen HJM.** (1979). *Environmental Chemistry of the Elements*. London. Academic Press. ISBN 0121204502.
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D, Asada K.** (1994). Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 199–218.
- Bradford M.** (1976). Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R.** (2000). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, USA. ISBN 0943088399.
- Bustos-Sanmamed P, Bazin J, Hartmann C, Crespi M, Lelandais-Brière C.** 2013. Small RNA pathways and diversity in model legumes: lessons from genomics. *Front. Plant Sci.* **4**, 236.
- Carrasco JA, Armario P, Pajuelo E, Burgos A, Caviedes MA, Lopez R, Chamber MA, Palomares AJ.** (2005). Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 1131–1140.
- Chandran D, Sharopova N, VandenBosch K, Garvin DF, Samac D.** (2008). Physiological and molecular characterization of aluminum resistance in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* **8**, 89.
- Chaney RL, Angle JS, Broadhurst CL, Peters C, Tappero R V, Sparks DL.** (2007). Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *J. Environ. Qual.* **36**, 1429–43.
- Chaoui A, El Ferjani E.** (2005). Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *C. R. Biol.* **328**, 23–31.
- Chen X.** (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 21–44.
- Chen CT, Chen L-M, Lin CC, Kao CH.** (2001). Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Sci.* **160**, 283–290.
- Chen L, Wang T, Zhao M, Tian Q, Zhang WH.** (2012a). Identification of aluminum-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *Planta* **235**, 375–86.
- Chen L, Wang T, Zhao M, Zhang W.** (2012b). Ethylene-responsive miRNAs in roots of *Medicago truncatula* identified by high-throughput sequencing at whole genome level. *Plant Sci.* **184**, 14–19.
- Cho UH, Seo NH.** (2005). Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci.* **168**, 113–120.
- Choi H, Kim D, Uhm T, Limpens E, Lim H, Mun JH, Kalo P, Penmetsa RV, Seres A, Kulikova O, Roe BA, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR.** (2004). A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* **166**, 1463–1502.

- Choudhary M, Jetley UK, Khan MA, Zutshi S, Fatma T.** (2007). Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotox. Environ. Safe.* **66**, 204–9.
- Clemens S.** (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**, 475–486.
- Clemens S.** (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**, 1707–19.
- Clemens S, Aarts MGM, Thomine S, Verbruggen N.** (2013). Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant Sci.* **18**, 92–99.
- Coba de la Peña T, Redondo FJ, Manrique E, Lucas MM, Pueyo JJ.** 2010. Nitrogen fixation persists under conditions of salt stress in transgenic *Medicago truncatula* plants expressing a cyanobacterial flavodoxin. *Plant Biotechnol. J.* **8**, 954–965.
- Cobbett C.** 2003. Heavy metals and plants – model systems and hyperaccumulators. *New Phytol.* **159**, 289–293.
- Cobbett C.** (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* **123**, 825–832.
- Cobbett C, Goldsbrough P.** (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 159–82.
- Conn S, Gilliam M.** (2010). Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Ann. Bot.* **105**, 1081–102.
- Considine MJ, Foyer CH.** (2014). Redox regulation of plant development. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 1305–26.
- Cui W, Gao C, Fang P, Lin G, Shen W.** (2013). Alleviation of cadmium toxicity in *Medicago sativa* by hydrogen-rich water. *J. Hazard. Mater.* **260**, 715–24.
- Cuyper A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, Opdenakker K, Nair AR, Munters E, Artois TJ, Nawrot T, Vangronsveld J, Smeets K.** (2010). Cadmium stress: An oxidative challenge. *Biometals* **23**, 927–940.
- DalCorso G, Farinati S, Maistri S, Furini A.** (2008). How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *J. Integr. Plant Biol.* **50**, 1268–80.
- DalCorso G, Manara A, Furini A.** (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: From roots to shoots. *Metallomics* **5**, 1117–1132.
- Dary M, Chamber-Pérez M a, Palomares a J, Pajuelo E.** (2010). “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J. Hazard. Mater.* **177**, 323–30.
- Dazy M, Béraud E, Cotellet S, Gréville F, Féraud JF, Masfaraud JF.** (2009). Changes in plant communities along soil pollution gradients: Responses of leaf antioxidant enzyme activities and phytochelatin contents. *Chemosphere* **77**, 376–383.
- Debnam PM, Fernie AR, Lisse A, Golding A, Bowsher CG, Grimshaw C, Knight JS, Emes MJ.** (2004). Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. *Plant J.* **38**, 49–59.
- Delauney AJ, Hu CA, Kishor PBK, Vermaq DPS.** (1993). Cloning of Ornithine δ -Aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by *trans*-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 18673–18676.
- Delauney A, Verma S.** (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* **4**, 215–223.

- Demidchik V, Sokolik A, Yurin V.** (1997). The Effect of Cu^{2+} on ion transport systems of the plant cell plasmalemma. *Plant Physiol.* **114**, 1313–1325.
- De Souza MP, Huang C, Chee N, Terry N.** 1999. Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants. *Planta* **209**, 259–263.
- Ding Y, Chen Z, Zhu C.** (2011). Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *J. Exp. Bot.* **62**, 3563–73.
- Dong J, Mao WH, Zhang GP, Wu FB, Cai Y.** (2007). Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity – a review. *Plant Soil Environ.* **53**, 193–200.
- Dong J, Wu F, Zhang G.** (2006). Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* **64**, 1659–1666.
- Dos Santos MN, Wieshammer G, Vega R, Wenzel WW.** (2007). Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. *Environ. Pollut.* **148**, 155–65.
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V.** (2000). Plant glutathione S-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* **5**, 193–198.
- Elmsey J.** (2001). *Nature's Building Blocks. An A-Z Guide to the Elements.* Oxford, UK.
- Ernst WHO.** (1998). Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level ecotoxicology. Wiley and Spektrum Akademischer, New York, pp 587–620.
- Ernst WHO, Krauss GJ, Verkleij JC, Wesenberg D.** (2008). Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant Cell Environ.* **31**, 123–43.
- Escande V, Garoux L, Grison C, Thillier Y, Debart F, Vasseur JJ, Boulanger C, Grison C.** (2014). Ecological catalysis and phytoextraction: Symbiosis for future. *Appl. Catal. B.* **146**, 279–288.
- Esteban E, Moreno E, Peñalosa J, Cabrero JI, Millán R, Zornoza P.** (2008). Short and long-term uptake of Hg in white lupin plants: Kinetics and stress indicators. *Environ. Exp. Bot.* **62**, 316–322.
- Fang X, Zhao Y, Ma Q, Huang Y, Wang P, Zhang J, Nian H, Yang C.** (2013). Identification and comparative analysis of cadmium tolerance-associated miRNAs and their targets in two soybean genotypes. *PloS One* **8**, e81471.
- Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811.
- Formey D, Sallet E, Lelandais-Brière C, Ben C, Bustos-Sanmamed P, Niebel A, Frugier F, Combiér JP, Debellé D, Hartmann C, Poulain J, Gavory F, Wincker P, Roux CH, Gentzbittel L, Gouzy J, Martin C.** (2014). The small RNA diversity from *Medicago truncatula* roots under biotic interactions evidences the environmental plasticity of the miRNAome. *Genome Biol.* **15**, 457.
- Foy CD, Chaney RL, White M.** (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**, 511–556.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert K.** (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* **92**, 696–717.
- Foyer CH, Noctor G.** (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* **119**, 355–364.

- Foyer CH, Noctor G.** (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**, 1866–75.
- Foyer CH, Noctor G.** (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 861–905.
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, García JA, Paz-Ares J.** 2007. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genet.* **39**, 1033–1037.
- Gadapati WR, Macfie SM.** (2006). Phytochelatins are only partially correlated with Cd-stress in two species of *Brassica*. *Plant Sci.* **170**, 471–480.
- Gallego SM, Pena LB, Barcia R, Azpilicueta CE, Iannone MF, Rosales EP, Zawoznik MS, Groppa MD, Benavides MP.** (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environ. Exp. Bot.* **83**, 33–46.
- Gielen H, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A.** (2012). MicroRNAs in metal stress: Specific roles or secondary responses?. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 15826–15847.
- Gomez E, Tiemann KJ, Parsons JG, Carrillo G, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL, De la Rosa G.** (2002). Potential of alfalfa plant to phytoremediate individually contaminated montmorillonite-soils with cadmium(II), chromium(VI), copper (II), nickel(II), and zinc(II). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **69**, 74–81.
- Graham PH, Vance CP.** (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant physiol.* **131**, 872–877.
- Gratão P, Polle A, Lea P, Acevedo R.** (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct. Plant Biol.* **32**, 481–494.
- Griffith OW.** (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207–12.
- Guan Z, Chai T, Zhang Y, Xu J, Wei W.** (2009). Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. *Chemosphere* **76**, 623–630.
- Guleria P, Mahajan M, Bhardwaj J, Yadav SK.** (2011). Plant small RNAs: Biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **9**, 183–99.
- Gupta OP, Sharma P, Gupta RK, Sharma I.** (2014). MicroRNA mediated regulation of metal toxicity in plants: present status and future perspectives. *Plant Mol.Biol.* **84**, 1–18.
- Gutteridge JMC, Halliwell B.** (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future. *Ann. NY Acad. Sci.* **899**, 136–147.
- Hakmaoui A, Barón M, Ater M.** (2006). Environmental biotechnology screening Cu and Cd tolerance in *Salix* species from North Morocco. *Afr. J. Biotechnol.* **5**, 1299–1302.
- Hall JL.** (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* **53**, 1–11.
- Halliwell B, Gutteridge J.** (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Ed 4. Oxford University Press, UK. ISBN 9780198568698.
- Halliwell B, Gutteridge J.** (1986). Iron and free radical reactions: Two aspects of antioxidant protection. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 172–174.
- Han K, Hwang C.** (2003). Salt tolerance enhanced by transformation of a *P5CS* gene in carrot. *J. Plant Biotechnology* **5**, 157–161.
- Handa S, Handa A, Hasegawa P, Bressan R.** (1986). Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.* **80**, 938–945.

- Hayashi F, Ichino T, Osanai M, Wada K.** (2000). Oscillation and regulation of proline content by P5CS and ProDH gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1096–1101.
- Heidstra R, Geurts R, Franssen H, Spaijk HP, Van Kammen A, Bisseling T.** (1994). Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant physiol.* **105**, 787–797.
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, Piette L, Magniette ML, Cuine S, Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou JP, Vavasseur A, Leonhardt N.** (2006). Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie* **88**, 1751–65.
- Higueras P, Oyarzun R, Lillo J, Sánchez-Hernández JC, Molina J, Esbrí JM, Lorenzo S.** (2006). The Almadén district (Spain): Anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites. *Sci. Total Environ.* **356**, 112–24.
- Hoagland D, Arnon D.** (1938). The water culture method for growing plants without soil. Agricultural Experimental Station Circle, University of California, Berkley, CA, USA.
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DPS.** (2000). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5- carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* **122**, 1129–1136.
- Hoque MA, Banu MNA, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y.** (2008). Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* **165**, 813–24.
- Huang SQ, Peng J, Qiu CX, Yang ZM.** (2009). Heavy metal-regulated new microRNAs from rice. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 282–7.
- Huang SQ, Xiang AL, Che LL, Chen S, Li H, Song JB, Yang ZM.** (2010). A set of miRNAs from *Brassica napus* in response to sulphate deficiency and cadmium stress. *Plant Biotechnol. J.*, 887–899.
- Islam MM, Hoque MA, Okuma E, Banu MNA, Shimoishi Y, Nakamura Y, Murata Y.** (2009). Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* **166**, 1587–97.
- Izawa S, Maeda K, Miki T, Mano J, Inoue Y, Kimura A.** (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptative response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* **817**, 811–817.
- Jabeen R, Ahmad A, Iqbal M.** (2009). Phytoremediation of heavy metals: Physiological and molecular mechanisms. *Bot. Rev.* **75**, 339–364.
- Jensen W.** (1962). *Botanical Histochemistry: Principles and Practice.* (SF W. H. Freeman and Company, Ed.). San Francisco.
- Johnson A, Singha N, Hashmatt M.** (2011). Metal–plant interactions: Toxicity and tolerance. In: *Bio management of Metal Contaminated Soils* (pp.29-63). Springer Netherlands.
- Jones-Rhoades MW.** (2012). Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Mol. Biol.* **80**, 3–16.
- Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A.** (2012). Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 3145–75.
- Khedr AH, Abbas M, Wahid AA, Quick WP, Abogadallah GM.** (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *J. Exp. Bot.* **54**, 2553–2562.

- Khraiweh B, Zhu J-K, Zhu J.** (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 137–148.
- Kishor PBK, Hong Z, Miao G-H, Hu C-A, Verma D.** 1995. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* **108**, 1387–1394.
- Kishor PBK, Sangam S, Amrutha RN, Laxmi PS, Naidu KR, Rao KRSS, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N.** (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* **88**, 424–438.
- Kramer MF.** (2011). Stem-Loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 15–10.
- Krämer U.** (2005). Phytoremediation: Novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 133–41.
- Krishnan N, Dickman M, Becker D.** (2009). Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 671–681.
- Kruszka K, Pieczynski M, Windels D, Bielewicz D, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z, Vazquez F.** (2012). Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments. *J. Plant Physiol.* **169**, 1664–72.
- Kuhlemier C.** (1992). Transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression in plants. *Plant Mol. Biol.* **19**, 1–14.
- Kuiper I, Lagendijk EL, Bloemberg G V, Lugtenberg BJJ.** (2004). Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction bioremediation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 6–15.
- Kular B, Leyland N, Mejia-carranza J, Reynolds H, Karpinski S, Mullineaux PM.** (2004). Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2448–2462.
- Kuriakose S V, Prasad MN V.** (2008). Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes. *Plant Growth Regul.* **54**, 143–156.
- Lagriffoul A, Mocquot B, Mench M, Vangronsveld J.** (1998). Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant Soil* **200**, 241–250.
- Lelli KM, Slattey M, Mann RS.** (2012). Disentangling the many layers of eukaryotic transcriptional regulation. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 43–68.
- León A, Palma J, Corpas F, Gomez M, Romero-Puertas M, Chatterjee D, Mateos R, del Río L, Sandalio L.** (2002). Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 813–820.
- Liu X, Yu F, Rodermeel S.** (2010). *Arabidopsis* chloroplast FtsH, var2 and suppressors of var2 leaf variegation: A review. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 750–761.
- López ML, Peralta-Videa JR, Benitez T, Gardea-Torresdey JL.** (2005). Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. *Chemosphere* **61**, 595–598.
- Losfeld G, Escande V, Jaffré T, L’Huillier L, Grison C.** (2012). The chemical exploitation of nickel phytoextraction: An environmental, ecologic and economic opportunity for New Caledonia. *Chemosphere* **89**, 907–10.
- Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ.** (2011). Root responses to cadmium in the rhizosphere: A review. *J. Exp. Bot.* **62**, 21–37.

- Maestri E, Marmiroli M, Visioli G, Marmiroli N.** (2010). Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environ. Exp. Bot.* **68**, 1–13.
- Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, Narasimhan ML, Hasegawa PM, Joly RJ, Bressan R.** 2002. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction?. *Plant J.* **31**, 699–712.
- Mallory AC, Vaucheret H.** (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genet.* **38**, S31–36.
- Marino D, Damiani I, Gucciardo S, Mijangos I, Pauly N, Puppo A.** (2013). Inhibition of nitrogen fixation in symbiotic *Medicago truncatula* upon Cd exposure is a local process involving leghaemoglobin. *J. Exp. Bot.* **64**, 5651–60.
- Marino D, González EM, Frendo P, Puppo A, Arrese-Igor C.** (2007). NADPH recycling systems in oxidative stressed pea nodules: a key role for the NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Planta* **225**, 413–21.
- Matés JM.** (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153**, 83–104.
- Matlack A.** (2001). Introduction to green chemistry. CRC Press.
- Mattick JS, Makunin IV.** (2006). Non-coding RNA. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 17–29.
- Matysik J, Bhalu B, Mohanty P.** (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci.* **82**, 525–532.
- McCarthy I, Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA.** (2001). Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant Cell Environ.* **24**, 1065–1073.
- McCord JM, Fridovich I.** (1969). Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049–6055.
- Mehta JP, Gaur SK.** (1999). Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol.* **143**, 253–259.
- Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A, Moreno-Sánchez R.** (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *Fems Microbiol. Rev.* **29**, 653–71.
- Mendoza-Soto AB, Sánchez F, Hernández G.** (2012). MicroRNAs as regulators in plant metal toxicity response. *Front. Plant Sci.* **3**, 105.
- Mhadhbi H, Fotopoulos V, Mylona P V, Jebara M, Elarbi Aouani M, Polidoros AN.** (2011). Antioxidant gene-enzyme responses in *Medicago truncatula* genotypes with different degree of sensitivity to salinity. *Physiol. Plant.* **141**, 201–14.
- Millán R, Gamarra R, Schmid T, Sierra MJ, Quejido a J, Sánchez DM, Cardona a I, Fernández M, Vera R.** (2006). Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain). *Sci. Total Environ.* **368**, 79–87.
- Miller G, Shulaev V, Mittler R.** (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plant.* **133**, 481–9.
- Miller G, Stein H, Honig A, Kapulnik Y, Zilberstein A.** (2005). Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation. *Planta* **222**, 70–9.
- Mithöfer A, Schulze B, Boland W.** (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: Evidence for common signals. *FEBS Lett.* **566**, 1–5.

- Mittler R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**, 405–410.
- Mittler R.** (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* **11**, 15–9.
- Moreno-Jiménez E, Vázquez S, Carpena-Ruiz R, Esteban E, Peñalosa J.** (2011). Using mediterranean shrubs for the phytoremediation of a soil impacted by pyritic wastes in southern Spain: A field experiment. *J. Environ. Manage.* **92**, 1584–1590.
- Narasimhamoorthy B, Blancaflor EB, Bouton JH, Payton ME, Sledge MK.** (2007). A comparison of hydroponics, soil, and root staining methods for evaluation of aluminum tolerance in (*Barrel Medic*) germplasm. *Crop Sci.* **47**, 321–328.
- Navarro-Aviñó J, Aguilar I, Lopez-Moya J.** (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* **16**, 10–25.
- Nihei N, Ohya T, Tanoi K, Iikura H, Kanke B.** (2005). Influence of mercury on soybean plants (*Glycine max* L.) at low pH. *Soil Sci. Plant Nutr.* **51**, 725–727.
- Noctor G.** (2006). Metabolic signalling in defence and stress: The central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ.* **29**, 409–425.
- Noctor G, Foyer CH.** 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 249–279.
- Ogawa I, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK.** (2009). Time course analysis of gene regulation under cadmium stress in rice. *Plant Soil* **325**, 97–108.
- Ortega-Villasante C, Hernández LE, Rellán-Alvarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO.** (2007). Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings. *New phytol.* **176**, 96–107.
- Ortega-Villasante C, Rellán-álvarez R, Del Campo F, Carpena-Ruiz R, Hernández L.** (2005). Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J. Exp. Bot.* **56**, 2239–2251.
- Pajuelo E, Rodríguez-Llorente I, Lafuente A, Caviede M.** (2011). Legume–rhizobium symbioses as a tool for bioremediation of heavy metal polluted soils. *Bio management of Metal Contaminated Soils*. pp 95-123
- Palatnik JF, Wollmann H, Schommer C, Schwab R, Boisbouvier J, Rodriguez R, Warthmann N, Allen E, Dezulian T, Huson D, Carrington JC, Weigel D.** (2007). Sequence and expression differences underlie functional specialization of *Arabidopsis* microRNAs miR159 and miR319. *Dev. Cell* **13**, 115–25.
- Paleg LG, Stewart GR, Bradbeer JW.** (1984). Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiol.* **75**, 974–978.
- Paradiso A, Berardino R, de Pinto MC, Sanità di Toppi L, Storelli MM, Tommasi F, De Gara L.** (2008). Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant Cell physiol.* **49**, 362–74.
- Pastori GM, Foyer CH.** 2002. Update on stress tolerance common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “ redox ” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* **129**, 460–468.
- Patra M, Sharma A.** (2000). Mercury Toxicity in Plants. *Bot. Rev.* **66**, 379-422.
- Peralta JR, Gardea-Torresdey JL, Tiemann KJ, Gomez E, Arteaga S, Rascon E, Parsons JG.** (2001). Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **66**, 0727–0734.

- Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL, Gomez E, Tiemann KJ, Parsons JG, Carrillo G.** (2002). Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. *Environ. pollut.* **119**, 291–301.
- Peralta-Videa JR, de la Rosa G, Gonzalez JH, Gardea-Torresdey JL.** (2004). Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Adv. Environ. Res.* **8**, 679–685.
- Peralta-Videa JR, Lopez ML, Narayan M, Saupe G, Gardea-torresdey J.** (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1665–1677.
- Pérez-Chaca MV, Rodríguez-Serrano M, Molina AS, Pedranzani HE, Zirulnik F, Sandalio LM, Romero-Puertas MC.** (2014). Cadmium induces two waves of reactive oxygen species in *Glycine max* (L.) roots. *Plant Cell Environ.* 1672–1687.
- Pérez-Sanz A, Millán R, Sierra MJ, Alarcón R, García P, Gil-Díaz M, Vazquez S, Lobo MC.** (2012). Mercury uptake by *Silene vulgaris* grown on contaminated spiked soils. *J. Environ. Manage.* **95**, S233–237.
- Pfaffl MW.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2002–2007.
- Phillips JR, Dalmay T, Bartels D.** (2007). The role of small RNAs in abiotic stress. *FEBS Lett.* **581**, 3592–7.
- Pilon-Smits E.** (2005). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**, 15–39.
- Pinto E, Sigaud-Kutner T, Leitao MA, Okamoto OK, , Morse D, Colepicolo P.** (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in Algae. *J. Phycol.* **39**, 1008–1018.
- Polle A, Schützendübel A.** (2003). Heavy metal signaling in plants: Linking cellular and organismic responses. In: *Plant responses to abiotic stress*, vol 4 (pp. 187–215) Springer, Berlin.
- Prasad MN V.** (1995). Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot.* **35**, 525–545.
- Prasad MNV.** (1998). Metal-biomolecule complexes in plants: Occurrence, functions and applications. *Analisis* **26**, 25–28.
- Prasad MNV.** (2003). Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: Hype for commercialization. *Russ. J. Plant Physiol.* **50**, 686–700.
- Prasad K, Saradhi P.** (1995). Effecto of Zn on free radicals and proline in *Brassica* and *Cajanus*. *Phytochemistry* **39**, 45–47.
- Rahoui S, Ben C, Chaoui A, Martinez Y, Yamchi A, Rickauer M, Gentzbittel L, El Ferjani E.** (2014). Oxidative injury and antioxidant genes regulation in cadmium-exposed radicles of six contrasted *Medicago truncatula* genotypes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 8070–8083.
- Rahoui S, Chaoui A, Ferjani E El.** (2008). Differential sensitivity to cadmium in germinating seeds of three cultivars of faba bean (*Vicia faba* L.). *Acta Physiol. Plant.* **30**, 451–456.
- Rahoui S, Chaoui A, El Ferjani E.** (2010). Reserve mobilization disorder in germinating seeds of *Vicia Faba* L. exposed to cadmium. *J. Plant Nutr.* **33**, 809–817.
- Rascio N, Navari-Izzo F.** (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* **180**, 169–81.
- Ray J, Kim E, Chen N.** (2003). Genetic transformation of *Medicago* species. In: *Applied Genetics of Leguminosae Biotechnology (Focus on Biotechnology)* (pp. 223–237) Springer Netherlands.
- Reichman SM.** (2007). The potential use of the legume–*rhizobium* symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biol. Biochem.* **39**, 2587–2593

- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmiño DM, Testillano PS, Risueño MC, Del Río L, Sandalio LM.** (2009). Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: Cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant physiol.* **150**, 229–43.
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio L, Sandalio LM.** (2006). Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ.* **29**, 1532–1544.
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Rodríguez-Serrano M, Gómez M, Del Río L, Sandalio LM.** (2007). Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J. Plant Physiol.* **164**, 1346–1357.
- Romero-Puertas M, Ortega-Galisteo A, Rodriguez-Serrano M, Sandalio L.** (2012). Insights into cadmium toxicity: Reactive oxygen and nitrogen species function. In: *Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation* (pp. 91–117) Springer, Berlin.
- Roth U, Von Roepenack-Lahaye E, Clemens S.** (2006). Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd²⁺. *J. Exp. Bot.* **57**, 4003–4013.
- Rubio MC, Ramos J, Webb KJ, Minchin FR, González E, Arrese-Igor C, Becana M.** (2001). Expression studies of superoxide dismutases in nodules and leaves of transgenic alfalfa reveal abundance of iron-containing isozymes, posttranslational regulation, and compensation of isozyme activities. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 1178–1188.
- Sabreen S, Sugiyama S.** (2008). Trade-off between cadmium tolerance and relative growth rate in 10 grass species. *Environ. Exp. Bot.* **63**, 327–332.
- Saeidi G, Rickauer M, Gentzbittel L, Borderouge D, Tolosan C.** (2012). Tolerance for cadmium pollution in a core-collection of the model legume, *Medicago truncatula* L. at seedling stage. *Aust. J. Crop Sci.* **6**, 641–648.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Del Rio L.** (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* **52**, 2115–2126.
- Sanita di Toppi L, Gabbriellini R.** (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* **41**, 105–130.
- Saradhi P, Alia S, Prasad K.** (1995). Proline accumulates in plants exposed to uv radiation and protects them against uv induced peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 1–5.
- Saradhi P, Mohanty P.** 1997. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **38**, 253–257.
- Sarma H.** (2011). Metal hyperaccumulation in plants: A review focusing on phytoremediation technology. *J. Environ. Sci. Technol.* **4**, 118–138.
- Sarwar N, Malhi SS, Zia H, Naeem A, Farid G, Zia MH, Bibi S.** 2010. Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 925–937.
- Sawahel WA, Hassan AH.** 2002. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotechnol. Lett.* 721–725.
- Schat H, Llugany M, Vooijs R, Jeanette H, Bleeker P.** (2002). The role of phytochelatin in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot.* **53**, 2381–2392.
- Schat H, Sharma S, Vooijs R.** (1997). Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.* **101**, 477–482.

- Schobert B, Tschesche H.** (1977). Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **541**, 270–277.
- Schützendübel A, Nikolova P, Rudolf C, Polle A.** (2002). Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus canescens* roots. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 577–584.
- Schützendübel A, Polle A.** (2002). Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* **53**, 1351–65.
- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-heyser R, Godbold DL, Polle A.** (2001). Cadmium-induces changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant physiol.* **127**, 887–898.
- Sharma SS, Dietz KJ.** (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* **14**, 43–50.
- Sharma SS, Schat H, Vooijs R.** (1998). In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry* **49**, 1531–1535.
- Shiyab S, Chen J, Han FX, Monts DL, Matta FB, Gu M, Su Y.** (2009). Phytotoxicity of mercury in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Ecotox. Environ. Safe.* **72**, 619–25.
- Shvaleva A, Coba de la Peña T, Rincón A, Morcillo CN, García de la Torre VS, Lucas MM, Pueyo JJ.** (2009). Flavodoxin overexpression reduces cadmium-induced damage in alfalfa root nodules. *Plant Soil* **326**, 109–121.
- Singh K, Foley RC, Oñate-Sánchez L.** (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 430–436.
- Singh M, Singh D, Rai M.** (2007). Assessment of growth, physiological and biochemical parameters and activities of antioxidative enzymes in salinity tolerant and sensitive basmati rice varieties. *J. Agron. Crop Sci.* **193**, 398–412.
- Siripornadulsil S, Traina S, Verma PS, Sayre RT.** (2002). Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* **14**, 2837–2847.
- Sledge MK, Bouton JH, Dall'Agnoll M, Parrott WA, Kochert G.** (2002). Identification and confirmation of aluminum tolerance QTL in diploid *Medicago sativa* subsp. *coerulea*. *Crop Sci.* **42**, 1121–1128.
- Sledge MK, Pechter P, Payton ME.** (2005). Aluminum tolerance in *Medicago truncatula* germplasm. *Crop Sci.* **45**, 2001.
- Smeets K, Opdenakker K, Remans T, Van Sanden S, Van Belleghem F, Semane B, Horemans N, Guisez Y, Vangronsveld J, Cuypers A.** (2009). Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. *J. Plant physiol.* **166**, 1982–92.
- Smeets K, Ruytinx J, Semane B, Van Belleghem F, Remans T, Van Sanden S, Vangronsveld J, Cuypers A.** (2008). Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environ. Exp. Bot.* **63**, 1–8.
- Smirnoff N, Cumbes J.** (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**, 1057–1060.
- Smith BW, Roe JH.** (1948). A photometric method for the determination of α -amylase in blood and urine with use of the starch-iodine color. *J. Biol. Chem.* **179**, 53–59.
- Sobrino-Plata J, Carrasco-Gil S, Abadía J, Escobar C, Álvarez-Fernández A, Hernández LE.** (2014a). The role of glutathione in mercury tolerance resembles its function under cadmium stress in *Arabidopsis*. *Metallomics* **6**, 356–66.

- Sobrino-Plata J, Meyssen D, Cuypers A, Escobar C, Hernández LE.** (2014b). Glutathione is a key antioxidant metabolite to cope with mercury and cadmium stress. *Plant Soil* **377**, 369–381.
- Sobrino-Plata J, Ortega-Villasante C, Flores-Cáceres ML, Escobar C, Del Campo FF, Hernández LE.** (2009). Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa. *Chemosphere* **77**, 946–54.
- Solanki R, Dhankhar R.** (2011). Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. *Biologia* **66**, 195–204.
- Song W-Y, Park J, Mendoza-Cózatl DG, Suter-Grotemeyer M, Shim D, Hörtensteiner S, Geisler M, Weder B, Rea P, Rentsch D, Schroeder JI, Lee Y, Martinoia E.** (2010). Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21187–21192.
- Sriprang R, Hayashi M, Yamashita M, Ono H, Saeki K, Murooka Y.** (2002). A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *J. Biotechnol.* **99**, 279–293.
- Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu JJ, Zhu JK.** (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci.* **12**, 301–309.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu J.** (2006). Posttranscriptional induction of two Cu / Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* **18**, 2051–2065.
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G.** (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* **35**, 259–70.
- Szabados L, Savaouré A.** (2009). Proline: A multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **15**, 89–97.
- Szittyá G, Moxon S, Santos DM, Jing R, Feveireiro MPS, Moulton V, Dalmay T.** (2008). High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families. *BMC genomics* **9**, 593.
- Trinh TH, Ratet P, Kondorosi E, Durand P, Kamaté K, Bauer P, Kondorosi A.** (1998). Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* **17**, 345–355.
- Tyler G, Pahlsson A, Bengtsson G, Baath E, Tranvink L.** (1989). Heavy metal ecology and terrestrial plants, microorganisms and invertebrates: A review. *Water Air Soil Pollut.* **47**, 189–215.
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gomez-Rodriguez MV., Chaki M, Pedrajas JR, Fernandez-Ocana A, Del Rio L, Barroso JB.** (2006). The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell Environ.* **29**, 1449–1459.
- Valdés-López O, Yang SS, Aparicio-Fabre R, Graham PH, Reyes JL, Vance CP, Hernández G.** (2010). MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytol.* **187**, 805–818.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP.** (2007). Protocol: A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* **3**, 12.
- Vaucheret H.** (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: Mechanisms and regulations. *Genes Dev.* **20**, 759–71.

- Verbruggen N, Hermans C.** (2008). Proline accumulation in plants: A review. *Amino acids* **35**, 753–9.
- Verdoy D, Coba de la Peña T, Redondo FJ, Lucas MM, Pueyo JJ.** (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* **29**, 1913–1923.
- Verma D.** (1999). Osmotic stress tolerance in plants: Role of proline and sulfur metabolisms. In: *Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants* (pp. 153–168), Austin, RG Landes.
- Verma S, Dubey RS.** (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.* **164**, 645–655.
- Wang X, Song Y, Ma Y, Zhuo R, Jin L.** (2011). Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environ. Pollut.* **159**, 3627–33.
- Wang F, Zeng B, Sun Z, Zhu C.** (2009). Relationship between proline and Hg²⁺-induced oxidative stress in a tolerant rice mutant. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **56**, 723–31.
- Weber M, Harada E, Vess C, Roepenack-Lahaye EV, Clemens S.** (2004). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J.* **37**, 269–281.
- Xu J, Wang W, Yin H, Liu X, Sun H, Mi Q.** (2009). Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. *Plant Soil* **326**, 321–330.
- Yadav SK.** (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S. Afr. J. Bot.* **76**, 167–179.
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H.** (2001). Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.* **125**, 199–208.
- Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T.** (2009). SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 347–61.
- Yang ZM, Chen J.** (2013). A potential role of microRNAs in plant response to metal toxicity. *Metallomics* **5**, 1184–90.
- Young N, Debellé F, Oldroyd G, Geurts R, Cannon S, Udvardi M, Benedito V, Mayer K, Gouzy, J Schoof H, Van de Peer Y, et al.,** (2012). The medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**, 520–524.
- Yu F, Liu X, Alsheikh M, Park S, Rodermeel S.** (2008). Mutations in supressor of variegation1, a factor required for normal chloroplast translation, suppress var2-mediated leaf variegation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 1786–1804.
- Zhang H, Jiang Y, He Z, Ma M.** (2005). Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). *J. Plant Physiol.* **162**, 977–984.
- Zhang X, Lin A, Chen B, Wang Y, Smith S, Smith F.** 2006. Effects of *Glomus mosseae* on the toxicity of heavy metals to *Vicia faba*. *Journal of Environmental Sciences* **18**, 721–726.
- Zhang W, Tyerman SD.** (1999). Inhibition of water channels by HgCl₂ in intact wheat root cells. *Plant Physiol.* **120**, 849–857.
- Zhao Z, Cai Y, Zhu Y, Kneer R.** (2005). Cadmium-induced oxidative stress and protection by L-galactono-1, 4-lactone in winner wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **168**, 1–5.

- Zhao FJ, McGrath SP.** (2009). Biofortification and phytoremediation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 373–380.
- Zhou ZS, Huang SQ, Guo K, Mehta SK, Zhang PC, Yang ZM.** (2007). Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. *J. Inorg. Biochem.* **101**, 1–9.
- Zhou ZS, Huang SQ, Yang ZM.** (2008a). Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 538–542.
- Zhou ZS, Wang SJ, Yang ZM.** (2008b). Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere* **70**, 1500–1509.
- Zhou ZS, Song JB, Yang ZM** (2012a). Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. *J. Exp. Bot.* **63**(12), 4597–4613.
- Zhou ZS, Zeng HQ, Liu ZP, Yang ZM.** (2012b). Genome-wide identification of *Medicago truncatula* microRNAs and their targets reveals their differential regulation by heavy metal. *Plant Cell Environ.* **35**, 86–99.
- Zhu C, Ding Y, Liu H.** (2011). MiR398 and plant stress responses. *Physiol. Plant.* **143**, 1–9.
- Zhu B, Su J, Chang M, Pal D, Verma S, Fan Y.** (1998). Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci.* **139**, 41–48.

Anexo

ANEXO FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS

1. Tablas suplementarias

Tabla Suplementaria 1. Incremento de la longitud de la raíz en presencia y ausencia de Hg o Cd después de 48 h en sistema hidropónico miniaturizado, para los 258 cultivares de *M. truncatula*, procedentes del sistema nacional de germoplasma vegetal del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (NPGS). * Diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía, $p \leq 0,05$, $n \geq 10$).

Cultivar	Control (cm)	Hg (cm)	Hg RRG	Cd (cm)	Cd RRG
PI 190082	1,54 ± 0,16	0,62 ± 0,13	40,04*	0,46 ± 0,11	29,87*
PI 190083	1,58 ± 0,17	0,51 ± 0,11	32,21*	0,65 ± 0,20	37,99*
PI 190084	2,46 ± 0,82	0,82 ± 0,09	33,33*	0,88 ± 0,18	35,77*
PI 190086	1,35 ± 0,11	0,95 ± 0,14	70,49*	0,62 ± 0,10	45,90*
PI 190089	2,06 ± 0,16	0,75 ± 0,12	36,41*	0,56 ± 0,10	27,18*
PI 190090	2,81 ± 0,07	0,92 ± 0,14	32,81*	0,94 ± 0,11	33,44*
PI 197341	1,59 ± 0,15	0,50 ± 0,16	31,45*	0,42 ± 0,23	26,42*
PI 197358	2,03 ± 0,20	1,49 ± 0,23	73,40*	1,21 ± 0,09	59,61
PI 197360	1,98 ± 0,21	0,89 ± 0,15	44,95*	0,77 ± 0,16	38,89*
PI 197361	1,65 ± 0,25	0,73 ± 0,13	44,25*	0,77 ± 0,25	46,26*
PI 199257	1,60 ± 0,20	0,25 ± 0,12	16,07*	0,14 ± 0,08	8,93*
PI 239876	2,42 ± 0,09	1,00 ± 0,21	41,32*	0,56 ± 0,25	23,14*
PI 239877	2,80 ± 0,21	0,66 ± 0,15	23,81*	0,70 ± 0,08	25,00*
PI 239878	1,27 ± 0,20	0,68 ± 0,17	53,48*	0,47 ± 0,08	36,70*
PI 243884	1,70 ± 0,15	0,94 ± 0,07	55,46*	0,67 ± 0,08	39,22*
PI 244285	1,87 ± 0,11	0,76 ± 0,11	41,07*	0,37 ± 0,06	19,64*
PI 283661	1,60 ± 0,22	0,78 ± 0,07	48,75*	0,47 ± 0,16	28,47*
PI 283662	1,46 ± 0,18	0,35 ± 0,10	24,24*	0,70 ± 0,16	47,73*
PI 284123	1,69 ± 0,15	0,85 ± 0,12	50,85*	0,63 ± 0,14	37,29*
PI 292434	1,54 ± 0,13	0,74 ± 0,15	48,05*	0,58 ± 0,10	37,88*
PI 292436	2,31 ± 0,27	0,56 ± 0,09	24,25*	0,66 ± 0,14	28,69*
PI 295607	2,12 ± 0,18	0,85 ± 0,12	40,09*	1,03 ± 0,09	48,74*
PI 319045	2,17 ± 0,20	0,46 ± 0,05	21,54*	1,27 ± 0,06	58,46*
PI 319051	2,36 ± 0,17	0,51 ± 0,06	21,82*	0,58 ± 0,12	24,51*
PI 384633	2,23 ± 0,08	0,26 ± 0,05	11,94*	0,40 ± 0,17	17,91*
PI 384634	1,41 ± 0,16	0,27 ± 0,01	19,70*	0,14 ± 0,15	9,75*
PI 384635	1,27 ± 0,19	0,35 ± 0,11	28,09*	0,24 ± 0,19	18,68*
PI 384636	0,97 ± 0,15	0,48 ± 0,16	49,48*	0,53 ± 0,11	54,64*
PI 384645	0,90 ± 0,15	0,53 ± 0,05	59,26*	0,23 ± 0,05	25,93*
PI 384647	2,36 ± 0,15	0,65 ± 0,12	27,46*	0,86 ± 0,24	36,34*
PI 384648	2,05 ± 0,18	0,57 ± 0,10	27,73*	0,49 ± 0,08	23,78*
PI 384649	2,37 ± 0,09	1,27 ± 0,51	53,68*	0,88 ± 0,17	36,84*
PI 384650	1,56 ± 0,11	0,33 ± 0,05	21,37*	0,70 ± 0,16	44,87*
PI 384655	1,62 ± 0,13	0,48 ± 0,10	30,14*	0,59 ± 0,22	36,30*
PI 384656	1,65 ± 0,24	0,61 ± 0,16	37,04*	0,47 ± 0,21	28,65*
PI 384660	1,60 ± 0,11	0,40 ± 0,08	25,00*	0,39 ± 0,11	24,31*

PI 384662	1,28 ± 0,21	0,50 ± 0,14	38,96*	0,68 ± 0,19	53,25*
PI 384664	2,30 ± 0,15	0,48 ± 0,13	21,12*	0,48 ± 0,16	20,65*
PI 384665	1,40 ± 0,12	0,50 ± 0,10	35,71*	0,41 ± 0,08	29,46*
PI 464815	3,32 ± 0,09	0,87 ± 0,12	26,32*	1,00 ± 0,08	30,08*
PI 464816	2,38 ± 0,21	0,67 ± 0,07	28,14*	0,50 ± 0,11	20,96*
PI 469099	1,45 ± 0,34	0,37 ± 0,09	25,86*	0,75 ± 0,31	51,72*
PI 469100	1,84 ± 0,15	0,38 ± 0,04	20,86*	0,51 ± 0,08	27,82*
PI 469102	1,56 ± 0,11	0,50 ± 0,12	32,05*	0,67 ± 0,08	42,74*
PI 493295	2,17 ± 0,11	0,67 ± 0,17	30,87*	0,56 ± 0,24	25,75*
PI 493296	1,21 ± 0,14	0,57 ± 0,13	47,42*	0,25 ± 0,12	20,62*
PI 493297	1,37 ± 0,21	0,58 ± 0,11	42,53*	0,55 ± 0,08	40,10*
PI 505438	2,05 ± 0,32	0,65 ± 0,15	31,71*	0,62 ± 0,12	31,98*
PI 516923	1,96 ± 0,08	0,73 ± 0,12	37,41*	0,38 ± 0,19	19,56*
PI 516924	1,38 ± 0,17	0,32 ± 0,04	23,19*	0,56 ± 0,13	40,58*
PI 516925	1,75 ± 0,19	0,60 ± 0,11	34,29*	0,65 ± 0,06	37,14*
PI 516926	2,04 ± 0,21	0,36 ± 0,08	18,00*	0,56 ± 0,16	27,34*
PI 516927	1,65 ± 0,20	0,60 ± 0,15	36,24*	0,27 ± 0,07	16,11*
PI 516928	2,07 ± 0,20	0,40 ± 0,08	19,35*	0,42 ± 0,21	20,16*
PI 516929	1,53 ± 0,13	1,21 ± 0,16	79,35*	1,32 ± 0,20	85,87
PI 516930	1,42 ± 0,11	0,58 ± 0,16	41,22*	0,43 ± 0,10	30,33*
PI 516931	2,32 ± 0,09	1,05 ± 0,12	45,16*	0,68 ± 0,10	29,03*
PI 516933	1,25 ± 0,12	0,87 ± 0,09	70,00*	1,13 ± 0,15	90
PI 516934	1,65 ± 0,10	0,61 ± 0,18	37,37*	0,73 ± 0,21	44,44*
PI 516935	2,57 ± 0,12	0,70 ± 0,11	27,18*	0,43 ± 0,15	18,35*
PI 516936	1,90 ± 0,19	1,02 ± 0,07	53,95*	0,96 ± 0,12	50,53*
PI 516937	1,84 ± 0,33	0,70 ± 0,20	37,98*	0,84 ± 0,14	45,45*
PI 516938	1,85 ± 0,17	1,25 ± 0,19	67,57*	0,88 ± 0,17	47,30*
PI 516939	1,47 ± 0,20	0,72 ± 0,09	49,15*	0,83 ± 0,05	55,93*
PI 516940	1,16 ± 0,25	0,33 ± 0,10	28,45*	0,41 ± 0,13	35,34*
PI 516942	2,18 ± 0,12	0,64 ± 0,07	29,41*	0,62 ± 0,10	28,47*
PI 516943	2,59 ± 0,19	0,70 ± 0,18	27,03*	0,84 ± 0,10	32,43*
PI 516944	2,41 ± 0,19	0,68 ± 0,14	28,55*	0,44 ± 0,23	18,24*
PI 516947	2,33 ± 0,25	0,54 ± 0,19	23,22*	0,79 ± 0,07	33,61*
PI 516948	1,33 ± 0,12	0,48 ± 0,15	36,43*	0,65 ± 0,09	48,75*
PI 516949	2,52 ± 0,09	1,00 ± 0,30	39,60*	0,70 ± 0,10	27,72*
PI 516950	1,33 ± 0,22	0,66 ± 0,25	49,50*	0,59 ± 0,09	44,25*
PI 517256	1,90 ± 0,36	0,45 ± 0,02	23,68*	0,67 ± 0,06	35,09*
PI 517257	1,68 ± 0,19	1,14 ± 0,53	67,89*	0,43 ± 0,17	25,25*
PI 535543	3,32 ± 0,10	0,76 ± 0,10	22,93*	0,98 ± 0,10	29,32*
PI 535546	0,68 ± 0,06	0,25 ± 0,02	36,46*	0,50 ± 0,10	72,92*
PI 535547	2,04 ± 0,15	0,68 ± 0,10	33,33*	0,52 ± 0,08	25,49*
PI 535548	2,45 ± 0,20	0,87 ± 0,12	35,71*	0,60 ± 0,29	24,49*
PI 535549	1,51 ± 0,20	0,63 ± 0,17	42,15*	0,68 ± 0,22	44,63*
PI 535550	2,33 ± 0,18	0,46 ± 0,22	20,00*	0,68 ± 0,10	29,05*
PI 535552	1,36 ± 0,21	0,70 ± 0,10	51,22*	0,40 ± 0,09	29,27*
PI 535554	2,40 ± 0,30	0,70 ± 0,19	29,17*	0,80 ± 0,11	33,33*

PI 535614	0,91 ± 0,08	0,32 ± 0,03	35,55*	0,61 ± 0,14	66,72*
PI 535615	0,94 ± 0,10	0,47 ± 0,06	49,76*	0,78 ± 0,08	82,59*
PI 535616	0,73 ± 0,09	0,20 ± 0,01	27,12*	0,28 ± 0,16	39,17*
PI 535618	0,68 ± 0,08	0,37 ± 0,08	55,74*	0,54 ± 0,05	80,33*
PI 535619	1,16 ± 0,05	0,60 ± 0,11	51,43*	1,43 ± 0,15	122,86*
PI 535622	0,62 ± 0,11	0,46 ± 0,07	74,00*	0,53 ± 0,09	84
PI 535648	2,06 ± 0,05	0,43 ± 0,05	20,97*	0,33 ± 0,13	16,13*
PI 535650	2,31 ± 0,09	0,45 ± 0,02	19,46*	2,05 ± 0,14	88,65*
PI 535652	1,65 ± 0,31	0,67 ± 0,11	40,69*	0,64 ± 0,16	38,96*
PI 535739	1,50 ± 0,08	0,80 ± 0,14	53,33*	0,67 ± 0,16	44,44*
PI 535752	1,54 ± 0,11	0,48 ± 0,08	31,71*	0,48 ± 0,10	30,89*
PI 564941	1,76 ± 0,15	0,55 ± 0,05	31,13*	0,40 ± 0,08	22,64*
PI 566886	1,65 ± 0,33	0,28 ± 0,01	16,97*	0,50 ± 0,09	34,48*
PI 566887	2,76 ± 0,23	0,66 ± 0,05	24,10*	1,03 ± 0,12	37,35*
PI 566890	2,10 ± 0,08	0,85 ± 0,05	40,48*	0,98 ± 0,10	46,43*
PI 577434	1,61 ± 0,05	0,45 ± 0,01	27,95*	0,64 ± 0,08	39,75*
PI 577597	1,50 ± 0,20	0,83 ± 0,05	55,56*	0,80 ± 0,17	53,33*
PI 577600	1,27 ± 0,08	0,65 ± 0,11	50,98*	0,85 ± 0,05	66,67*
PI 577601	2,16 ± 0,16	1,02 ± 0,07	47,22*	0,49 ± 0,09	22,69*
PI 577603	2,47 ± 0,23	0,70 ± 0,08	28,25*	0,89 ± 0,11	35,82*
PI 577604	2,43 ± 0,37	1,15 ± 0,23	47,35*	0,87 ± 0,08	35,88*
PI 577607	2,22 ± 0,73	1,06 ± 0,08	48,12*	0,79 ± 0,16	35,45*
PI 577608	2,50 ± 0,21	1,00 ± 0,17	40,00*	0,58 ± 0,08	23,20*
PI 577609	2,21 ± 0,11	0,55 ± 0,10	24,81*	0,53 ± 0,10	24,06*
PI 577610	2,66 ± 0,23	0,90 ± 0,18	33,83*	0,90 ± 0,10	33,83*
PI 577611	2,60 ± 0,26	0,61 ± 0,06	23,63*	0,63 ± 0,10	24,18*
PI 577612	1,16 ± 0,13	0,81 ± 0,07	70,00*	0,47 ± 0,11	40,41*
PI 577613	2,15 ± 0,12	0,97 ± 0,09	45,35*	0,85 ± 0,13	39,53*
PI 577614	1,38 ± 0,10	0,40 ± 0,10	28,87*	0,30 ± 0,12	21,65*
PI 577615	2,45 ± 0,19	0,70 ± 0,08	28,57*	0,50 ± 0,14	20,41*
PI 577616	2,16 ± 0,13	0,30 ± 0,08	13,91*	0,39 ± 0,07	17,88*
PI 577617	2,30 ± 0,25	0,50 ± 0,08	21,74*	0,65 ± 0,19	28,26*
PI 577618	2,03 ± 0,42	0,40 ± 0,08	19,70*	0,38 ± 0,16	18,61*
PI 577619	2,02 ± 0,26	1,03 ± 0,12	51,24*	0,67 ± 0,18	33,06*
PI 577620	2,40 ± 0,31	0,97 ± 0,18	40,63*	0,69 ± 0,09	28,70*
PI 577623	1,26 ± 0,18	0,52 ± 0,16	41,27*	0,40 ± 0,17	31,75*
PI 577624	3,00 ± 0,1	0,68 ± 0,08	22,67*	0,34 ± 0,17	11,33*
PI 577625	2,40 ± 0,10	0,30 ± 0,03	12,50*	0,30 ± 0,14	12,50*
PI 577626	2,55 ± 0,13	1,56 ± 0,13	61,44*	0,54 ± 0,12	21,08*
PI 577627	1,62 ± 0,15	0,60 ± 0,08	36,92*	0,58 ± 0,04	35,69*
PI 577628	1,30 ± 0,24	0,60 ± 0,15	46,15*	0,14 ± 0,15	10,77*
PI 577629	2,22 ± 0,16	0,23 ± 0,02	10,70*	0,38 ± 0,13	17,02*
PI 577630	1,25 ± 0,12	0,67 ± 0,07	53,71*	0,80 ± 0,08	64,00*
PI 577633	2,13 ± 0,07	0,24 ± 0,05	11,41*	0,84 ± 0,05	39,60*
PI 577634	2,22 ± 0,58	0,82 ± 0,15	37,16*	0,76 ± 0,19	34,23*
PI 577636	2,23 ± 0,16	1,10 ± 0,08	49,25*	0,80 ± 0,09	35,82*

PI 577637	1,40 ± 0,4	0,45 ± 0,07	32,65*	0,40 ± 0,10	28,57*
PI 577639	2,32 ± 0,35	0,62 ± 0,20	26,70*	0,55 ± 0,14	23,68*
PI 577640	1,71 ± 0,22	0,78 ± 0,13	45,99*	0,50 ± 0,13	29,20*
PI 577641	1,80 ± 0,12	0,50 ± 0,10	27,78*	0,40 ± 0,19	22,22*
PI 577642	3,16 ± 0,44	0,56 ± 0,02	17,80*	1,33 ± 0,17	42,19*
PI 577643	2,06 ± 0,23	1,41 ± 0,21	68,57*	1,02 ± 0,19	49,37*
PI 577646	2,43 ± 0,11	0,83 ± 0,05	34,25*	0,97 ± 0,06	39,73*
PI 641406	1,47 ± 0,17	0,38 ± 0,12	26,22*	0,74 ± 0,09	50,38*
PI 641407	2,50 ± 0,20	0,48 ± 0,13	19,50*	0,51 ± 0,11	20,50*
PI 641408	0,75 ± 0,08	0,50 ± 0,14	66,67*	0,38 ± 0,06	50,67*
PI 641409	2,67 ± 0,16	0,72 ± 0,09	26,97*	0,69 ± 0,16	25,73*
PI 641410	1,58 ± 0,18	0,77 ± 0,20	48,95*	1,07 ± 0,42	67,67*
PI 641411	2,35 ± 0,17	0,69 ± 0,09	29,36*	0,45 ± 0,12	19,15*
PI 641412	3,14 ± 0,50	1,25 ± 0,20	39,81*	0,93 ± 0,24	29,57*
PI 641413	2,42 ± 0,39	0,49 ± 0,08	20,23*	0,54 ± 0,09	22,48*
W5 5987	0,73 ± 0,05	0,30 ± 0,02	40,91*	0,23 ± 0,06	31,82*
W6 23646	2,35 ± 0,08	1,01 ± 0,16	42,92*	1,03 ± 0,15	43,87*
W6 4996	1,31 ± 0,09	0,78 ± 0,13	59,49*	0,68 ± 0,17	51,90*
W6 5010	1,70 ± 0,10	0,63 ± 0,11	37,25*	0,57 ± 0,06	33,33*
W6 5018	1,40 ± 0,12	0,58 ± 0,10	41,43*	1,04 ± 0,09	74,29*
W6 5963	2,92 ± 0,17	0,56 ± 0,19	19,43*	0,75 ± 0,05	25,71*
W6 5966	2,15 ± 0,20	0,75 ± 0,12	34,88*	0,78 ± 0,15	36,43*
W6 5968	2,42 ± 0,08	0,70 ± 0,10	28,93*	0,66 ± 0,11	27,27*
W6 5969	2,22 ± 0,22	0,70 ± 0,12	31,53*	1,08 ± 0,15	48,65*
W6 5970	1,70 ± 0,20	0,63 ± 0,02	37,25*	0,52 ± 0,13	30,59*
W6 5973	1,90 ± 0,12	0,63 ± 0,08	33,33*	0,67 ± 0,12	35,09*
W6 5974	2,34 ± 0,26	0,66 ± 0,15	28,21*	0,34 ± 0,15	14,53*
W6 5977	2,92 ± 0,16	0,51 ± 0,3	17,71*	0,73 ± 0,14	25,14*
W6 5978	2,31 ± 0,19	0,92 ± 0,17	40,12*	1,00 ± 0,08	43,21*
W6 5979	2,58 ± 0,70	0,50 ± 0,11	22,24*	0,57 ± 0,18	22,10*
W6 5983	2,50 ± 0,15	0,66 ± 0,05	26,40*	1,00 ± 0,08	40,00*
W6 5986	2,73 ± 0,05	0,93 ± 0,11	34,15*	0,63 ± 0,06	23,17*
W6 5988	1,28 ± 0,13	0,54 ± 0,05	42,19*	0,52 ± 0,08	40,63*
W6 5990	1,80 ± 0,20	0,41 ± 0,10	22,92*	0,54 ± 0,13	32,24*
W6 5991	2,55 ± 0,16	0,48 ± 0,13	18,95*	0,63 ± 0,05	24,84*
W6 5992	2,26 ± 0,60	1,80 ± 0,30	79,41	0,30 ± 0,08	13,24*
W6 5997	1,94 ± 0,09	0,70 ± 0,10	36,03*	0,66 ± 0,13	33,82*
W6 5998	1,52 ± 0,19	0,58 ± 0,03	38,16*	0,73 ± 0,13	48,03*
W6 5999	1,53 ± 0,21	0,23 ± 0,02	15,22*	0,20 ± 0,15	13,04*
W6 6001	2,42 ± 0,22	0,65 ± 0,19	26,80*	0,40 ± 0,17	16,49*
W6 6002	1,60 ± 0,17	0,44 ± 0,05	27,50*	0,38 ± 0,21	23,44*
W6 6004	0,97 ± 0,05	0,53 ± 0,10	55,17*	0,57 ± 0,05	58,62*
W6 6008	2,50 ± 0,14	0,88 ± 0,11	35,33*	1,00 ± 0,09	40,00*
W6 6009	2,28 ± 0,22	1,06 ± 0,16	46,72*	0,83 ± 0,11	36,29*
W6 6010	2,13 ± 0,17	0,34 ± 0,15	16,11*	0,50 ± 0,19	23,49*
W6 6011	2,02 ± 0,17	0,44 ± 0,11	21,82*	0,30 ± 0,12	14,88*

W6 6012	1,52 ± 0,16	0,62 ± 0,09	41,12*	0,76 ± 0,11	49,53*
W6 6014	2,15 ± 0,10	0,35 ± 0,02	16,61*	0,56 ± 0,34	25,91*
W6 6015	3,30 ± 0,12	0,30 ± 0,08	9,09*	0,14 ± 0,05	4,24*
W6 6016	2,36 ± 0,27	0,82 ± 0,06	34,74*	0,67 ± 0,13	28,17*
W6 6017	1,12 ± 0,11	0,46 ± 0,07	41,11*	0,43 ± 0,14	37,78*
W6 6018	2,58 ± 0,27	0,46 ± 0,02	18,09*	0,52 ± 0,13	20,03*
W6 6019	1,20 ± 0,11	1,70 ± 0,23	141,67*	1,00 ± 0,18	83,33
W6 6020	1,63 ± 0,25	1,06 ± 0,32	65,31	0,70 ± 0,12	42,86*
W6 6021	2,28 ± 0,14	0,62 ± 0,04	27,41*	0,64 ± 0,05	28,07*
W6 6022	2,92 ± 0,20	0,62 ± 0,14	21,20*	0,42 ± 0,12	18,21*
W6 6023	1,70 ± 0,50	1,32 ± 0,20	77,94	1,13 ± 0,10	66,18
W6 6025	1,53 ± 0,16	1,01 ± 0,11	66,30*	0,75 ± 0,10	48,91*
W6 6027	3,08 ± 0,16	0,66 ± 0,19	21,43*	1,22 ± 0,08	39,61*
W6 6028	2,40 ± 0,15	0,51 ± 0,07	21,53*	1,19 ± 0,23	49,40*
W6 6030	1,45 ± 0,27	0,82 ± 0,10	56,55*	0,47 ± 0,25	32,18*
W6 6031	2,07 ± 0,09	0,52 ± 0,09	25,30*	0,56 ± 0,18	26,99*
W6 6032	1,43 ± 0,05	0,47 ± 0,09	33,15*	0,48 ± 0,11	43,64*
W6 6033	1,82 ± 0,08	0,90 ± 0,12	49,45*	0,76 ± 0,05	41,76*
W6 6034	2,50 ± 0,24	0,58 ± 0,12	23,20*	0,28 ± 0,13	11,20*
W6 6035	1,70 ± 0,38	0,62 ± 0,18	36,97*	0,52 ± 0,13	28,49*
W6 6037	1,67 ± 0,05	1,25 ± 0,05	74,63*	0,70 ± 0,08	41,79*
W6 6040	1,67 ± 0,25	0,47 ± 0,07	28,23*	0,31 ± 0,08	18,71*
W6 6041	3,36 ± 0,22	1,66 ± 0,13	49,50*	0,90 ± 0,02	26,73*
W6 6042	0,86 ± 0,37	0,50 ± 0,08	58,14	0,46 ± 0,15	53,49*
W6 6044	2,32 ± 0,14	0,76 ± 0,05	32,76*	0,54 ± 0,05	23,28*
W6 6046	2,45 ± 0,25	0,80 ± 0,15	32,65*	0,88 ± 0,15	36,05*
W6 6047	1,60 ± 0,24	0,36 ± 0,05	22,50*	0,32 ± 0,04	20,00*
W6 6048	1,56 ± 0,22	0,40 ± 0,07	25,60*	0,46 ± 0,11	29,60*
W6 6050	1,70 ± 0,10	0,46 ± 0,11	27,06*	0,58 ± 0,08	34,12*
W6 6054	3,05 ± 0,17	0,81 ± 0,10	26,78*	1,00 ± 0,14	32,79*
W6 6055	1,65 ± 0,10	0,46 ± 0,08	28,28*	0,58 ± 0,08	35,35*
W6 6056	3,10 ± 0,25	1,30 ± 0,27	41,94*	1,04 ± 0,30	33,64*
W6 6057	2,11 ± 0,21	1,33 ± 0,18	63,31*	0,61 ± 0,16	28,99*
W6 6058	2,53 ± 0,24	1,15 ± 0,10	45,39*	1,00 ± 0,11	39,47*
W6 6059	1,52 ± 0,29	0,45 ± 0,13	29,67*	0,44 ± 0,28	29,01*
W6 6060	1,49 ± 0,22	0,51 ± 0,22	34,33*	0,68 ± 0,13	45,52*
W6 6062	3,12 ± 0,32	0,98 ± 0,14	31,41*	1,19 ± 0,14	38,14*
W6 6063	1,93 ± 0,35	0,66 ± 0,10	34,48*	0,60 ± 0,12	31,03*
W6 6064	1,81 ± 0,22	0,86 ± 0,02	47,59*	0,86 ± 0,13	47,59*
W6 6065	2,42 ± 0,29	0,67 ± 0,09	27,84*	0,95 ± 0,79	39,18*
W6 6066	1,78 ± 0,16	0,71 ± 0,07	40,19*	0,75 ± 0,10	42,06*
W6 6067	1,90 ± 0,20	0,60 ± 0,10	31,58*	0,77 ± 0,20	40,60*
W6 6068	1,58 ± 0,10	0,54 ± 0,10	34,18*	0,50 ± 0,11	31,65*
W6 6072	3,2 ± 0,83	0,52 ± 0,04	16,25*	0,52 ± 0,04	16,25*
W6 6073	2,68 ± 0,13	0,61 ± 0,11	23,01*	0,50 ± 0,20	18,66*
W6 6074	1,32 ± 0,09	0,67 ± 0,17	50,94*	0,78 ± 0,13	58,49*

W6 6075	1,92 ± 0,08	0,92 ± 0,10	47,92*	0,66 ± 0,11	34,38*
W6 6076	1,51 ± 0,27	0,78 ± 0,20	52,07*	1,01 ± 0,08	66,94*
W6 6077	1,16 ± 0,15	0,68 ± 0,13	58,62*	0,44 ± 0,05	37,93*
W6 6078	2,40 ± 0,21	0,56 ± 0,06	23,33*	1,04 ± 0,13	43,33*
W6 6079	1,61 ± 0,21	0,78 ± 0,18	48,67*	0,71 ± 0,17	44,25*
W6 6080	1,50 ± 0,19	1,05 ± 0,07	70,48*	0,47 ± 0,13	31,43*
W6 6081	1,23 ± 0,22	0,63 ± 0,10	51,35*	0,52 ± 0,16	41,89*
W6 6082	2,48 ± 0,14	0,81 ± 0,11	32,89*	0,58 ± 0,12	23,49*
W6 6084	1,65 ± 0,23	0,42 ± 0,02	25,76*	0,60 ± 0,20	36,36*
W6 6085	1,52 ± 0,29	0,53 ± 0,10	35,04*	0,68 ± 0,10	44,67*
W6 6086	1,77 ± 0,12	0,58 ± 0,15	33,06*	0,30 ± 0,20	16,94*
W6 6087	1,70 ± 0,15	0,46 ± 0,03	27,06*	0,76 ± 0,13	44,71*
W6 6088	2,34 ± 0,25	1,07 ± 0,11	45,73*	1,01 ± 0,15	43,29*
W6 6089	1,52 ± 0,21	0,75 ± 0,16	49,45*	0,73 ± 0,14	48,35*
W6 6090	2,13 ± 0,11	0,82 ± 0,12	38,93*	0,91 ± 0,11	42,95*
W6 6092	3,30 ± 0,16	0,90 ± 0,08	27,27*	1,03 ± 0,10	31,06*
W6 6095	2,33 ± 0,17	0,85 ± 0,15	36,43*	0,38 ± 0,08	16,43*
W6 6097	1,70 ± 11	0,55 ± 0,05	32,35*	0,90 ± 0,08	52,94*
W6 6098	1,85 ± 0,10	0,62 ± 0,09	33,78*	0,50 ± 0,08	27,03*
W6 6099	1,62 ± 0,04	0,46 ± 0,07	28,46*	0,73 ± 0,09	44,62*
W6 6100	3,32 ± 0,16	0,70 ± 0,08	21,08*	0,78 ± 0,08	23,49*
W6 6102	1,85 ± 0,66	0,62 ± 0,10	33,78*	0,53 ± 0,15	28,83*
W6 6103	3,63 ± 0,34	0,46 ± 0,03	12,75*	0,20 ± 0,23	5,51*
W6 6104	2,22 ± 0,57	1,00 ± 0,23	45,05*	0,50 ± 0,32	22,52*
W6 6105	2,63 ± 0,08	1,21 ± 0,09	46,20*	0,62 ± 0,17	23,42*
W6 6107	1,60 ± 0,23	1,60 ± 0,31	100	0,45 ± 0,29	28,13*
W6 6108	2,30 ± 0,17	0,82 ± 0,17	35,87*	0,37 ± 0,12	15,94*
W6 6109	2,23 ± 0,14	0,75 ± 0,07	33,97*	0,80 ± 0,10	35,90*
W6 6111	1,65 ± 0,18	0,21 ± 0,02	13,13*	0,32 ± 0,08	19,39*
W6 6112	2,70 ± 0,17	0,63 ± 0,12	23,46*	1,19 ± 0,11	43,92*
W6 6113	2,26 ± 0,26	0,54 ± 0,15	24,02*	0,58 ± 0,20	25,49*
W6 6115	2,26 ± 0,10	0,90 ± 0,14	39,71*	0,88 ± 0,16	38,97*
W6 6116	1,72 ± 0,13	0,46 ± 0,08	27,13*	0,93 ± 0,08	54,26*
W6 6118	1,09 ± 0,19	0,47 ± 0,21	43,12*	0,60 ± 0,19	55,05*
W6 6119	2,47 ± 0,13	0,21 ± 0,13	8,56*	0,33 ± 0,21	13,51*
W6 6120	1,47 ± 0,09	0,92 ± 0,09	62,71*	0,75 ± 0,06	50,85*
W6 6140	2,13 ± 0,05	0,63 ± 0,05	29,69*	0,83 ± 0,06	39,06*
W6 6142	2,66 ± 0,16	0,58 ± 0,14	22,04*	0,76 ± 0,10	28,49*

Tabla Suplementaria 2. Contenido de macronutrientes nutrientes de los cultivares de *M. truncatula*, crecidos en sobres de cultivo hidropónico con 0 ó 100 μM CdCl_2 durante 12 días.

Macronutrientes ($\mu\text{g/g}$)									
		PI 199257		PI 384634		PI 516929		PI 516933	
	CdCl_2 (μM)	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea
K	0	50577 a	83970 a	44575 b	64135 a	40749 a	66033 a	58245 a	79092 a
	100	54814 a	60665 b	48576 a	53056 b	44605 a	71336 a	52258 b	71325 a
Ca	0	3637 a	4871 a	4123 a	2380 a	2648 a	4244 a	3375 a	5721 a
	100	3243 b	2075 b	2952 b	822 b	2442 b	2663 b	3205 b	2596 b
Na	0	1643 a	675 b	1983 a	597a	1348 a	517 a	1443 a	654 a
	100	978 b	5106 a	1650 b	562 a	938 b	500 a	1106 b	525 b
Mg	0	1211 a	2069 a	1689 a	1347 a	1206 a	1456 a	1025 b	1672 a
	100	1228 a	1562 b	1469 b	1278 a	1075 b	1385 a	1204 a	1499 b
P	0	5793 a	5143 a	3015 a	5576 a	3454 a	3944 a	3856 a	5007 a
	100	5213 b	3516 b	2835 b	3848 b	2656 b	3004 b	3545 b	4097 b
S	0	1174 b	1296 a	2199 a	2327 a	1757 b	2557 a	2246 a	1870 a
	100	1546 a	1028 b	1526 b	1393 b	2330 a	1329 b	1754 b	1163 b
		PI 516950		W6 6019		W6 6023		W6 6142	
	CdCl_2 (μM)	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea
K	0	51150 a	74378 a	48148 a	72238 a	59248 a	68454 a	50838 a	56325 a
	100	51131 a	56235 b	42685 b	44657 b	51069 b	60056 b	44686 b	53260 a
Ca	0	3191 b	3850 a	4174 b	3638 a	3095 a	3597 a	2517 b	4419 a
	100	3863 a	1336 b	5675 a	263 b	3013 a	1875 b	3946 a	2145 b
Na	0	1535 b	610 b	1809 b	595 a	1487 a	545 a	1353 a	423 a
	100	1826 a	886 a	2420 a	505 b	843 b	517 b	882 b	417 a
Mg	0	1115 b	1757 a	1399 b	1576 a	1036 a	1664 a	1080 a	1697 a
	100	1484 a	1600 b	1617 a	831 b	1083 a	1352 b	978 b	1552 b
P	0	4798 a	5329 a	3089 a	5956 a	3890 a	4377 a	5570 a	5375 a
	100	2740 b	3819 b	2848 b	2230 b	3689 a	3170 b	4608 b	4017 b
S	0	2656 a	2690 a	1311 b	1963 a	880 b	1151 a	1702 a	2176 a
	100	2027 a	1471 b	2056 a	1138 b	1413 a	951 b	1820 a	1036 b

Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía, $p \leq 0,05$, $n=3$).

Tabla Suplementaria 3. Contenido de micronutrientes nutrientes de los cultivares de *M. truncatula*, crecidos en sobres de cultivo hidropónico con 0 ó 100 μM CdCl_2 durante 12 días.

Micronutrientes ($\mu\text{g/g}$)									
		PI 199257		PI 384634		PI 516929		PI 516933	
	CdCl_2 (μM)	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea
Fe	0	116 a	69 a	290 a	88 a	73 b	51 a	141 b	55 a
	100	80 b	68 a	126 b	71 b	108 a	52 a	401 a	61 a
Mn	0	142 a	49 a	204 a	61 a	239 a	41 b	189 a	45 b
	100	85 b	47 a	52 b	42 b	80 b	45 a	96 b	48 a
Zn	0	55 b	34 a	164 b	140 a	77 a	27 b	104 b	44 a
	100	70 a	24 b	173 a	42 b	62 a	30 a	117 a	32 b
Cu	0	57 b	31 a	208 a	75 a	38 b	14 b	136 a	27 a
	100	75 a	15 b	165 b	23 b	46 a	26 a	108 b	17 b
		PI 516950		W6 6019		W6 6023		W6 6142	
	CdCl_2 (μM)	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea
Fe	0	126 b	75 b	225 b	225 a	102 b	71 a	121 a	57 a
	100	477 a	173 a	353 a	80 b	110 a	55 b	105 b	56 b
Mn	0	239 a	50 b	209 a	55 a	127 a	40 b	267 a	48 a
	100	28 b	61 a	45 b	31 b	93 b	49 a	69 b	40 b
Zn	0	181 b	38 b	240 a	38 b	80 a	41 a	133 a	40 a
	100	299 a	67 a	110 b	67 a	46 b	47 a	79 b	37 b
Cu	0	125 b	27 b	206 a	27 b	106 a	35 a	71 b	21 b
	100	265 a	52 a	192 b	64 a	60 b	29 b	84 a	25 a

Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre control y tratamiento (ANOVA de una vía, $p \leq 0,05$, $n=3$).

2. Figuras suplementarias

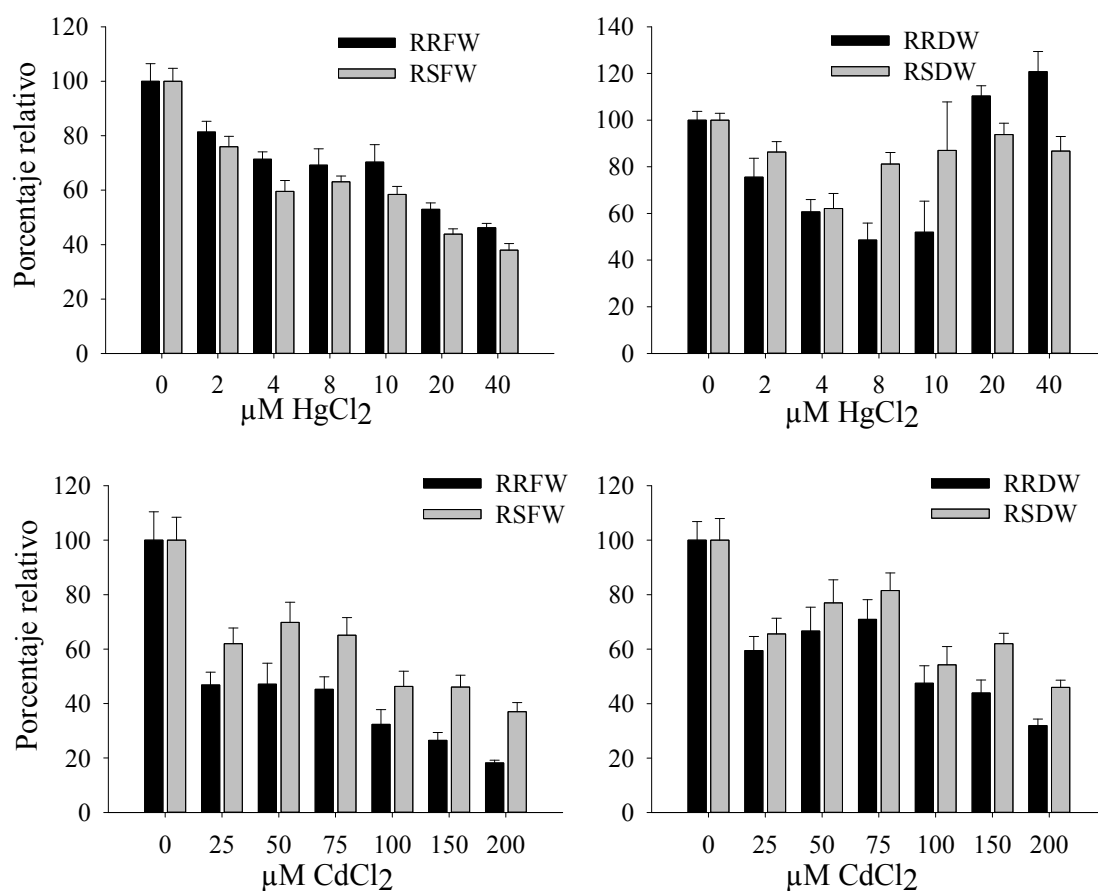


Figura Suplementaria 1. Pesos frescos relativos de la raíz (RRFW) y de la parte aérea (RSFW) y pesos secos relativos de la raíz (RRDW) y de la parte aérea (RSDW) en plantas de *M. truncatula* (Gaertn.) cv. Parabinga, expuestas a diferentes concentraciones de Hg (0-40 $\mu\text{M HgCl}_2$) o Cd (0-200 $\mu\text{M CdCl}_2$), durante 20 días en sobres de crecimiento hidropónico.

ANEXO PUBLICACIONES

- V.S. García de la Torre**, T. Coba de la Peña, M.M. Lucas and J.J. Pueyo. Rapid screening of *Medicago truncatula* germplasm for mercury tolerance at the seedling stage. *Environmental and Experimental Botany* (2013) 91:90-96.
- V.S. García de la Torre**, T. Coba de la Peña, J.J. Pueyo and M.M. Lucas. *Medicago truncatula* germplasm screening for cadmium tolerance. Nutritional status and oxidative stress in tolerant and sensitive cultivars. *Nutrición mineral de las plantas como base de una agricultura sostenible*. ISBN-10: 84-695-5571-5, ISBN-13: 978-84-695-5571-2. Book chapter (2012) 383-389. Digital edition, editors: I. Bonilla Mangas, L. E. Hernández, J. J. Lucena Marotta. Madrid, Spain.
- V.S. García de la Torre**, T. Coba de la Peña, J.J. Pueyo and M.M. Lucas. Assessment of growth, nutritional status, reserves mobilization, gene expression and enzyme activities in Cd tolerant and sensitive *Medicago truncatula* cultivars identified with a rapid screening method.
En preparación
- V.S. García de la Torre**, T. Coba de la Peña, M.M. Lucas and J.J. Pueyo. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) from *Vigna aconitifolia* improved germination, physiological state, antioxidant defence and glutathione and phytochelatins synthesis on *Medicago truncatula*.
En preparación
- V.S. García de la Torre**, P. Bustos, J.J. Pueyo, M.M. Lucas and M. Crespi. MicroRNAs as first signal of metal sensibility synthesis on *Medicago truncatula*.
En preparación